

Table des matières

Index des figures.....	5
Index des tableaux.....	7
Abréviations	9
INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS.....	11
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
Chapitre 1 : Mécanismes de défense contre les agents pathogènes.....	17
I. <i>Mytilus edulis</i>.....	18
1. Généralités	18
2. Ecologie et répartition	19
3. Anatomie et nutrition	19
4. Reproduction et cycle de vie	22
II. Défenses immunitaires de la moule bleue	23
1. L'immunité cellulaire.....	23
1.1. Les hémocytes	23
1.2. Les mécanismes de défense cellulaire.....	24
1.2.1. La phagocytose	25
1.2.2. L'encapsulation.....	31
1.2.3. La mort cellulaire programmée	31
2. L'immunité humorale.....	32
2.1. Cascade de la prophénoloxydase	32
2.2. Enzymes lysosomales hydrolytiques	33
2.3. Inhibiteurs de protéases.....	33
2.4. Peptides antimicrobiens	34
III. Pathologies	35
IV. Les bactéries du genre <i>Vibrio</i>	37
1. Caractéristiques phénotypiques, écologiques et taxonomiques	37
1.1. Caractéristiques phénotypiques.....	37
1.2. Caractéristiques écologiques.....	38
1.3. Taxonomie	38

2.	Pouvoir pathogène.....	41
2.1.	Les vibrions pathogènes pour l'Homme	41
2.1.1.	<i>V. cholerae</i>	42
2.1.2.	<i>V. parahaemolyticus</i>	42
2.1.3.	<i>V. vulnificus</i>	43
2.2.	Les vibrions pathogènes des organismes marins	43
2.2.1.	Chez les poissons	43
2.2.2.	Chez les coraux	44
2.2.3.	Chez les crustacés.....	45
2.2.4.	Chez les mollusques	45
3.	Facteurs de virulence	47

Chapitre 2 : Mécanismes de défense contre les contaminants chimiques : le système MXR

..... **51**

I. Contamination chimique des milieux aquatiques 52

1.	Impact des polluants	52
2.	Biosurveillance	53

II. Mécanismes de défense contre les xénobiotiques 54

1.	Les métallothionéines	55
2.	Les enzymes de phase 0, I, II et III	55
3.	Le système MXR	56

III. Les Transporteurs ABC effecteurs du phénotype MXR 57

1.	La famille ABC	57
1.1.	Structure.....	57
1.2.	Mécanismes de transport.....	59
2.	Les principaux transporteurs impliqués dans la résistance MDR/MXR	60
2.1.	La P-glycoprotéine (Pgp).....	60
2.2.	Les Multidrug related proteins (MRPs)	61
2.3.	La Breast cancer resistance protein (BCRP)	62
3.	Les outils d'étude du système MXR chez les bivalves	62
3.1.	Détection moléculaire et protéique	63
3.2.	Approche fonctionnelle biochimique	64
4.	Régulation du système MXR chez les bivalves	65
4.1.	Par les contaminants	65
4.2.	Effet saison	66

MATERIEL ET METHODE.....	71
I. Souches bactériennes.....	72
1. Préparation des suspensions bactériennes.....	72
2. Transformation en souches GFP	72
II. Contaminants chimiques	73
III. Modèles d'exposition	73
1. <i>In vitro</i>	73
2. <i>In vivo</i>	74
2.1. Injection.....	74
2.2. Cohabitation	74
2.3. Balnéation.....	75
RESULTATS	77
Chapitre 1: étude de l'interaction des souches de <i>V. Splendidus</i> et <i>Mytilus edulis</i>.....	79
Article 1 : Isolement d'un <i>Vibrio</i> pathogène pour la moule bleue et capable d'altérer ses fonctions immunitaires.....	81
Article 2: Dynamiques d'infection de <i>V. splendidus</i> pathogène pour <i>M. edulis</i> : interactions <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> avec les hémocytes.....	95
Chapitre 2: étude du système MXR et de sa modulation par les contaminants chimiques chez <i>Mytilus edulis</i>.....	125
Article 3: MXR chez <i>Mytilus edulis</i> : Caractérisation moléculaire et fonctionnelle du transporteur ABCG2 dans les hémocytes et les branchies	127
Article 4: Régulation des gènes du système MXR dans les branchies et les hémocytes de <i>Mytilus edulis</i> : effets des contaminants et de la saison	153
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	175
I. Étude des interactions entre <i>M. edulis</i> et <i>V. Splendidus</i> sp.....	176
1. Isolement et caractérisation de <i>V. splendidus</i> 10/068 1T1, pathogène de <i>M. edulis</i>	176
2. <i>V. splendidus</i> 10/068 1T1 altère les fonctions hémocytaires	177
3. <i>V. splendidus</i> 10/068 1T1 infecte <i>Mytilus edulis</i> en endommageant les branchies	179

II. Le système MXR chez <i>Mytilus edulis</i>	181
1. Le transporteur ABCG2 contribue au phénotype MXR chez <i>M. edulis</i>	181
2. ABCG2 est un transporteur actif dans les hémocytes et les branchies.....	182
3. Modulation de l'expression des gènes par les contaminants	184
III. Conclusion générale et perspectives	186
Références.....	189
ANNEXES	225
Annexe 1 : Motilité des hémocytes adhérentes en tant que potentiel marqueur	
d'immunocompétence et des effets immunotoxiques des bivalves	227

Index des figures

Figure 1. Représentation schématique des interactions environnement-hôte-pathogène	13
Figure 2. Classification phylogénétique des mollusques	18
Figure 3. Anatomie de la moule	20
Figure 4. Organisation schématique des branchies	21
Figure 5. Système circulatoire typique chez les bivalves.....	21
Figure 6. Processus de filtration chez <i>Mytilus edulis</i>	22
Figure 7. Stades de développement sexuel de <i>Mytilus edulis</i>	22
Figure 8. Représentation schématique des activités immunitaires cellulaires des invertébrés après une invasion par des microorganismes	25
Figure 9. Représentation schématique des différents stades de la phagocytose et de l'encapsulation.	26
Figure 10. Les différentes voies impliquées dans la production des EOR et ENR par les hémocytes de bivalves.....	30
Figure 11. Formation de la mélanine sous l'action de la PO après phagocytose de sporonts de <i>Marteilia sydneyi</i> par les hémocytes de <i>Saccostrea glomerata</i>	32
Figure 12. Diversité phénotypique de deux souches appartenant au groupe <i>Vibrio Splendidus</i> (<i>V. crassostreae</i> et <i>V. tasmaniensis</i>) sur le milieu TCBS	37
Figure 13. Micrographie de <i>Vibrio pectenica</i> souche A365T sur milieu solide montrant les flagelles polaires et latéraux (×14000) obtenue en microscopie électronique à transmission .	37
Figure 14. Arbre phylogénétique fondé sur le séquençage de huit gènes de référence	40
Figure 15. Impact des polluants sur les organismes et l'écosystème	53
Figure 16. Métabolisme des xénobiotiques au niveau cellulaire	56
Figure 17. Structure des transporteurs ABC et séquences d'acides aminés caractéristiques des domaines NBDs.....	58
Figure 18. Mécanisme de transport des pompes ABC selon le modèle « ATP-switch ».....	59

Figure 19. Structure de la Pgp	60
Figure 20. Structure des transporteurs MRP1 et MRP2	61
Figure 21. Structure de la BCRP	62
Figure 22. Diagrammes de Venn représentant des exemples de sondes fluorescentes allocrites et de modulateurs des transporteurs ABC humains.	64
Figure 23. Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale suivie pour l'étude de l'interaction des bactéries de <i>V. Splendidus</i> et <i>M. edulis</i>	80
Figure 24. Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale suivie pour l'étude du système MXR chez <i>M. edulis</i> et sa modulation par les contaminants chimiques.....	126
Figure 25. Représentation du processus infectieux de <i>V. splendidus</i> 10/068 1T1 d'après l'ensemble des résultats obtenus	180
Figure 26. Diagrammes de Venn représentant les sondes fluorescentes allocrites (A) et les inhibiteurs (B) des transporteurs ABC chez <i>Mytilus edulis</i>	183
Figure 27. Observation microscopique des hémocytes incubés avec la calcéine AM (CAM) à 0.25 μ M pendant 15 min en absence ou en présence du bloqueur MK571 (30 μ M, 30 min)	184
Figure 28. Mortalités accumulées des moules après exposition aux bactéries non virulentes 12/056 M24T1.....	186

Index des tableaux

Tableau 1. Récapitulatif des différentes populations des hémocytes de <i>Mytilus edulis</i>	24
Tableau 2. Exemples d'enzymes lysosomales chez les mollusques bivalves	33
Tableau 3. Exemples de maladies et d'agents pathogènes affectant les bivalves	36
Tableau 4. Association des espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes avec les syndromes cliniques	41
Tableau 5. Exemples d'espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes pour les mollusques bivalves	46
Tableau 6. Les différents facteurs de la virulence décrits chez <i>Vibrio</i>	47
Tableau 7. Récapitulatif des études décrivant l'induction du phénotype MXR chez les bivalves par des contaminants chimiques ou biologiques	67
Tableau 8. Exemples d'études décrivant l'inhibition du phénotype MXR chez les bivalves par des contaminants chimiques ou biologiques	69
Tableau 9. Caractéristiques des souches utilisées pour la transformation	72

Abréviations

ABC: ATP Binding Cassette	GFP: Green Fluorescent Protein
ABCP: Placenta specific ABC protein	GST: Glutathione-S-Transférase
ADN: Acide DésoxyriboNucléique	HAPs: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
Ag: Argent	Hg: Mercure
AHR: Aryl Hydrocarbon Receptor	JOD: Juvenile Oyster Disease
AMPs: AntiMicrobial Peptides	LB: Luria Bertani
ARNm: Acide RiboNucléique messenger	LBS: Luria Bertani Salé
ARNr: Acide RiboNucléique ribosomal	LPS: LipoPolysaccharide
ATP: Adénosine Tyrosine Phosphate	LRR: Leucin Rich Repeats
BaP: Benzo[a]Pyrène	MA: Marine Agar
BRD: Brown Ring Disease	MDR: Multidrug Resistance
BCRP: Breast Cancer Resistance Protein	MLSA: MultiLocus Sequences Analysis
cAMP: cyclic Adénosine monophosphate	MLST: Multilocus Sequence Typing
Cd: Cadmium	MPO: MyeloPeroxidase
Cg-Timp: <i>Crassostrea gigas</i> Tissue Inhibitor of Metalloprotease	MRPs: Multidrug Resistance Proteins
CPS: Capsule PolySaccharidique	MSDs: Membrane Spanning Domains
CT: Cholera Toxin	MSX: Multi-nucleated unknown
CYP: Cytochrome P450	MT: Métallothionéine
Cu: Cuivre	MXR: Multixenobiotic Resistance
DDE: 1,1-Dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)Ethylene	NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate
DO: Densité Optique	NBDs: Nucleotide Binding Domains
DMSO: DiMéthylSulfOxyde	NO: Nitric Oxyde
ECps: Extracellular Products	NOS: NO Synthase
ENR: Espèces Nitriques Réactives	OMVs: Outer Membrane Vesicles
EOR: Espèces Oxygénées Réactives	OVVD: Oyster Velar Virus Disease
FBG: Fibrinogène-like	PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns
FREP: Fibrinogen-RElated Protein	

PBDE: PolyBromoDiphényleéthers
PCBs: Polychlorobiphényles
Pgp: P-glycoprotéine
PGRP: Peptidoglycan Recognition Protein
PKA: Protein kinase A
PMA: Phorbol Myristate Acetate
PO: PhénolOxydase
PRP: Pattern Recognition Proteins
PRR: Pattern Recognition Receptors
QX: Queensland Unknown
RTX: Repeats in Toxin
SOD: Superoxidase Dismutase
SSO: Seaside Organism
SSTT: Système de Sécrétion de Type Trois
TCBS: Thiosulfate-Citrate-Bile Saltsucrose agar
TDH: Thermostable Direct Hemolysin
TIMP: Inhibiteurs Tissulaires des MétalloProtéases
TLR: Toll-Like Receptors
TRH: TDH-Related Hemolysin
UFC: Unité Formant Colonies
VBNC: Viable Non Cultivable

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS

Les moules marines sont des mollusques bivalves fréquemment trouvés sur le littoral en zone intertidale. A leur intérêt économique -le chiffre d'affaires annuel de la mytiliculture française est estimé à 150 millions d'euros (["Comité National de la Conchyliculture"](#))- s'ajoute leur utilisation scientifique depuis de nombreuses années dans des programmes de surveillance environnementale en tant qu'espèces bioindicatrices. A titre d'exemple, il convient de citer le programme Mussel Watch aux Etats Unis ou encore le Réseau d'Observation de la Contamination CHimique du littoral (ROCCH) ([Beliaeff et al., 2002](#)). Ces organismes filtreurs sont en effet exposés à une multitude de contaminants biologiques et chimiques qu'ils sont capables de bioaccumuler ([Sánchez-Marín et al., 2016](#); [Williams et al., 1997](#)), voire de bioconcentrer ([Gilroy et al., 2014](#); [Ricciardi et al., 2016](#)).

Les moules sont considérées parmi les espèces les plus résistantes aux contaminants. Contrairement aux autres bivalves comme les huîtres ou les palourdes, les animaux du genre *Mytilus* ne sont pas affectés par les maladies infectieuses ni dans le milieu naturel ni dans les élevages ([Travers et al., 2015](#)). De plus, malgré leur exposition chronique aux xénobiotiques dans certaines régions à haute pollution, les mortalités sont en général faibles. Néanmoins, différentes réponses biologiques sont engendrées notamment sur le plan des fonctions immunitaires et sont utilisées comme biomarqueurs d'exposition ou d'effet ([Auffret et al., 2006](#); [Gravato et al., 2005](#); [Taleb et al., 2007](#)).

En 2010, dans le cadre du réseau de surveillance de la santé des mollusques marins sur le littoral français REPAMO¹ mis en place par Ifremer², des mortalités de la moule bleue ont été déclarées en élevage et en gisements naturels ([Guichard et al., 2011](#)). En 2014, le taux de mortalités dans les cheptels mytilicoles a dramatiquement évolué jusqu'à atteindre les 100% dans certains secteurs des Pertuis Charentais ([Bechemin et al., 2014](#)). Face à l'ampleur sans précédents de cet évènement, un programme spécifique MORBLEU a été établi pour en identifier les causes. Les premières investigations ont mis en évidence des conditions environnementales particulières telles que des baisses successives de salinité, des pics importants de turbidité et une température de l'eau supérieure de 1-2°C par rapport à la médiane interannuelle. La présence de bactéries du genre *Vibrio* a été également démontrée ([Bechemin et al., 2014](#); [Travers et al., 2016](#)).

¹ REPAMO : REseau de Pathologie des Mollusques

² Ifremer : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

D'après [Snieszko \(1974\)](#) Le déclenchement d'une maladie chez un organisme résulte souvent de l'interaction entre l'hôte, l'organisme pathogène et l'environnement (**Figure 1**). Dès lors, l'évaluation du niveau d'immunocompétence de ces animaux est susceptible de fournir des données déterminantes pour établir des corrélations entre les fluctuations des paramètres environnementaux et l'état de santé des populations.

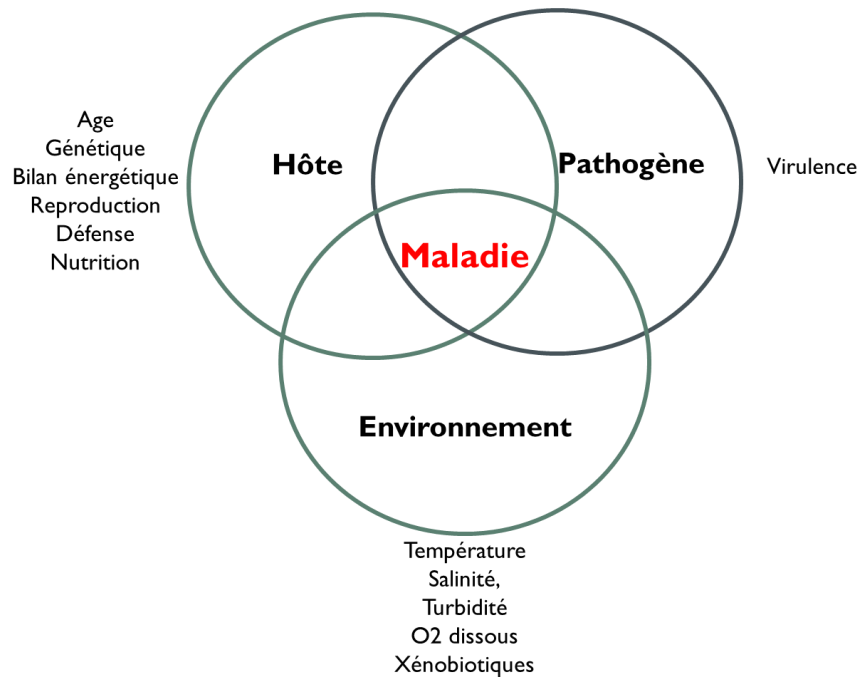


Figure 1. Représentation schématique des interactions environnement-hôte-pathogène d'après [Snieszko 1974](#) modifié

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est d'étudier les mécanismes de défense hémoducal de *Mytilus edulis* en interaction avec les agents pathogènes et les contaminants chimiques.

Le premier chapitre est dédié aux interactions de la moule bleue avec les espèces de *Vibrio Splendidus*. D'abord, la caractérisation de la virulence des isolats bactériens obtenus à partir d'animaux sains ou moribonds entre 2010 et 2013 et leur classification phylogénétique nous a permis de sélectionner une souche pathogène *V. splendidus* 10/068 1T1 qui servira de modèle pour la suite. Puis, les réponses hémoducal face à cette bactérie ont été explorées et comparées systématiquement avec une bactérie non virulente et phylogénétiquement proche (article 1). Enfin, les dynamiques d'infection du pathogène ont été suivies à travers l'élaboration d'un modèle expérimental *in vivo* (article 2).

Le deuxième chapitre concerne l'étude du phénotype MXR dans les hémocytes et les branchies de la moule bleue et sa modulation par les xénobiotiques. Un nouveau transporteur a été identifié et caractérisé sur le plan moléculaire et fonctionnel (article 3). Par la suite, l'effet des contaminants sur l'expression des gènes des trois transporteurs abcb, abcc et abcg2 a été suivi dans les branchies et les hémocytes de moules 1) exposés au BaP au laboratoire ou 2) prélevées à partir de sites différentiellement contaminés à différentes saisons (article 4).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Mécanismes de défense contre les agents pathogènes



I. *Mytilus edulis*

1. Généralités

Le phylum des mollusques est l'un des plus larges, diversifiés et importants groupes du règne animal (Gosling, 2008). Il renferme des métazoaires des plus étranges et des plus familiers (**Figure 2**). Parmi les classes majeures représentatives des mollusques, on retrouve le groupe des gastéropodes avec plus de 100 000 espèces suivi des bivalves contenant plus de 15000 espèces (Encyclopædia Britannica, 2016; Gosling, 2015).

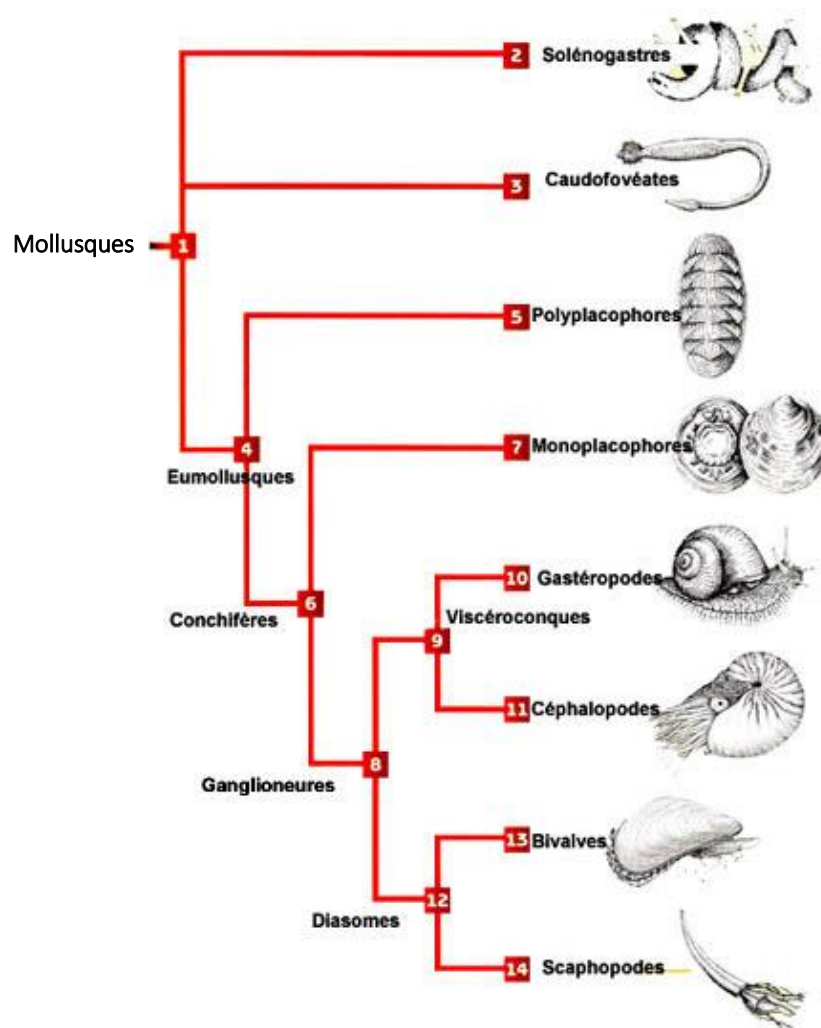


Figure 2. Classification phylogénétique des mollusques (Lecointre and Guyader, 2001)
 (4) les eumollusques sont caractérisés par un pied développé, un manteau qui délimite un sillon ou une cavité palléale contenant les branchies et dont les glandes sécrètent des plaques coquillères, (6) les conchifères sont caractérisés primitivement par une coquille univalve ou bivalve (acquisition secondaire) (8) les ganglioneures sont caractérisés par la réduction du nombre de muscles rétracteurs du pied (9) les viscéroconques sont caractérisés par une coquille qui ne protège primitivement que les viscères qui sont entourés du manteau; la tête est bien développée et contient un système nerveux ganglionnaire condensé (12) les diasomes sont caractérisés par la disparition de la tête; le manteau et la coquille entourent la totalité de l'animal. Le pied est en forme de "hache" ou de "doigt". La larve véligère qui a une coquille primitivement à une valve, acquiert ensuite une structure bivalve.

Les bivalves, appelés également lamellibranches, sont caractérisés par leur forme comprimée latéralement avec une symétrie bilatérale conservée et une coquille composée de deux valves articulées entre elles par une charnière médiodorsale et un ligament non calcifié. Une autre caractéristique de cette classe est l'absence de la tête et du radula, organe typique de la plupart des mollusques (Lecointre and Guyader, 2001).

La moule bleue fait partie des représentants les plus connus des bivalves. Elle appartient à la famille des mytilidés et au genre *Mytilus*. L'appellation « moule bleue » peut se référer à plusieurs espèces (*Mytilus trossulus*, *M. edulis* et *M. galloprovincialis*) du fait que ces organismes frères sont capables de se reproduire entre eux et générer des hybrides (Hilbish et al., 2002; Toro et al., 2004). Toutefois, malgré la ressemblance morphologique, ils possèdent des physiologies distinctes et une répartition géographique différente (Gosling, 2008). Dans ce manuscrit, la dénomination « moule bleue » désigne l'espèce *Mytilus edulis*, objet de ce travail.

2. Ecologie et répartition

Mytilus edulis vit en milieu marin dans la zone de balancement des marées (zone intertidale) et dans les eaux peu profondes en se fixant solidement à des substrats durs par le biais des fibres du byssus. Cet organisme sessile s'attache également aux autres individus en formant des amas pour mieux se protéger contre les vagues (Gosling, 2008). La moule présente un modèle de grande distribution, principalement dû à sa capacité de supporter de larges fluctuations de salinités, dessiccation, température et oxygène. Elle a une aire de répartition très vaste dans le monde. Elle est présente au sud de l'océan Arctique et au nord des océans Atlantique et Pacifique. Sur la côte Est américaine, ses populations se distribuent du Labrador à la Caroline du Nord (Wells and Gray, 1960). En Europe, on trouve cette espèce dans l'Atlantique, en France, sur la côte de la Nouvelle-Zemble et l'Islande. La moule bleue colonise l'estran, zone qui s'étend de la ligne du flux maximum (vives eaux) à la ligne de reflux maximum (mortes eaux).

3. Anatomie et nutrition

La moule a une coquille de forme triangulaire et allongée avec des bords arrondis, formée de deux valves symétriques, réunies du côté antérieur par un ligament élastique (Figure 3). Un deuxième muscle adducteur situé au pôle postérieur permet l'ouverture de l'animal lors de son alimentation. A l'intérieur de la coquille, on trouve le manteau et les organes internes de l'animal (estomac, foie, reins, gonade, cœur, bouche). Le manteau est constitué de deux lobes

de tissus tapissés de cellules nerveuses. Il est également responsable de la sécrétion des couches de la coquille.

La moule possède un long pied qu'elle peut sortir par l'entrebâillement de la coquille et utiliser pour se déplacer. A la base de cette saillie musculaire se trouve la glande byssogène permettant la formation du byssus. Ce dernier est constitué d'un disque adhésif muni de nombreux filaments de nature protéique très résistants que l'animal peut rompre les uns après les autres pour se déplacer.

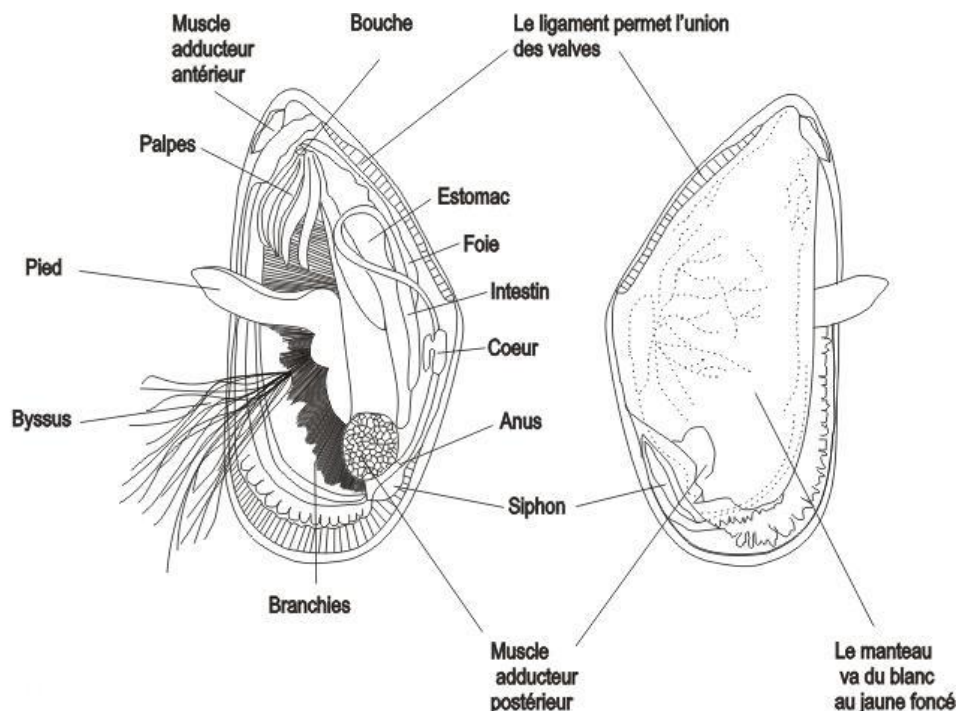


Figure 3. Anatomie de la moule

Deux branchies flottent dans la cavité palléale contre la masse viscérale. Chaque branchie a la forme d'un "W" et est formée par un feuillet direct qui descend de l'axe branchial et se replie au niveau du sillon marginal pour former le feuillet réfléchi avec son sillon dorsal (**Figure 4**). Ces feuillets comprennent des longs filaments à fines structure avec une orientation dorsale-ventrale. La paroi des filaments est constituée d'un épithélium simple qui porte de nombreux cils : cils frontaux, latéro-frontaux et latéraux. Ceux-ci sont animés de mouvements ondulatoires incessants qui entretiennent la circulation de l'eau dans la cavité palléale.

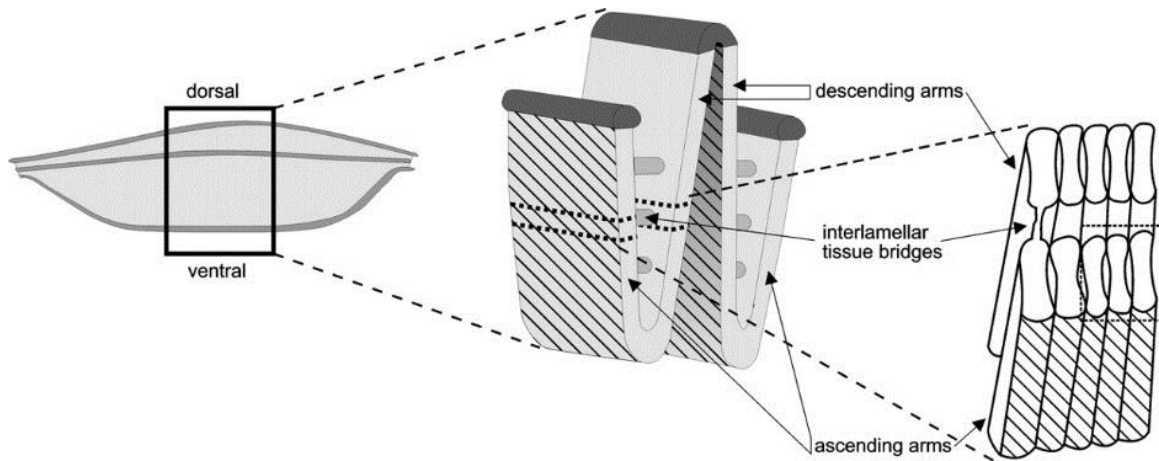


Figure 4. Organisation schématique des branchies d'après Luckenbach and Epel (2008)

Le système circulatoire est composé du cœur dorsal qui comprend deux oreillettes latérales et un ventricule (**Figure 5**). L'hémolymphe, incolore, est propulsée à partir du ventricule dans deux aortes pour être distribuée aux différentes parties de l'organisme par un réseau de vaisseaux sanguins. Le système artériel, qualifié de diffus, aboutit à des espaces libres sans parois propres : les lacunes. Ainsi l'hémolymphe n'est plus canalisée dans des vaisseaux individualisés et baigne directement les tissus. Elle circule vers les reins pour purification puis gagne les branchies où elle s'enrichit en oxygène avant de retourner aux oreillettes du cœur. L'hémolymphe assure de nombreuses fonctions physiologiques comme les échanges des gaz dissous, l'osmorégulation, la distribution des nutriments et l'élimination des déchets. Elle joue aussi le rôle de fluide squelettique, assurant la rigidité de certains organes comme les palpes labiaux, le pied ou encore le bord de manteau (Gosling, 2008).

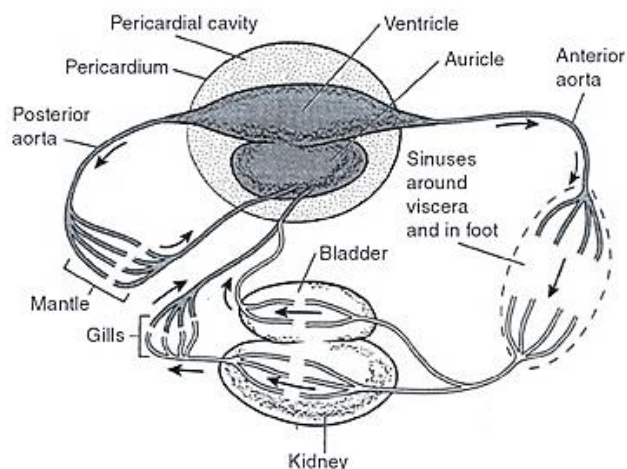


Figure 5. Système circulatoire typique chez les bivalves. Les régions ombrées montrent la voie de l'hémolymphe oxygénée d'après Pechenik 2010 (Gosling, 2015)

Mytilus edulis est un animal filtreur et microphage. Elle se sert de ses branchies pour recueillir le seston nécessaire à son alimentation et l'oxygène nécessaire à sa respiration. L'eau de mer chargée en particules et en oxygène dissous est pompée par le siphon inhalant, ensuite propulsée hors de la cavité palléale par le siphon exhalant (**Figure 6**). Les nombreux cils vibratiles des branchies sont responsables de l'entretien du courant d'eau mais assurent également un courant permanent de mucus amenant la nourriture vers les palpes labiaux et ensuite vers la bouche. Ainsi, les fines particules, essentiellement des algues microscopiques, sont ingérées et digérées par le système digestif et les plus grosses particules sont rejetées. Quant à l'oxygène capté, il pénètre dans l'hémolymphe pour être distribué dans tout l'organisme.

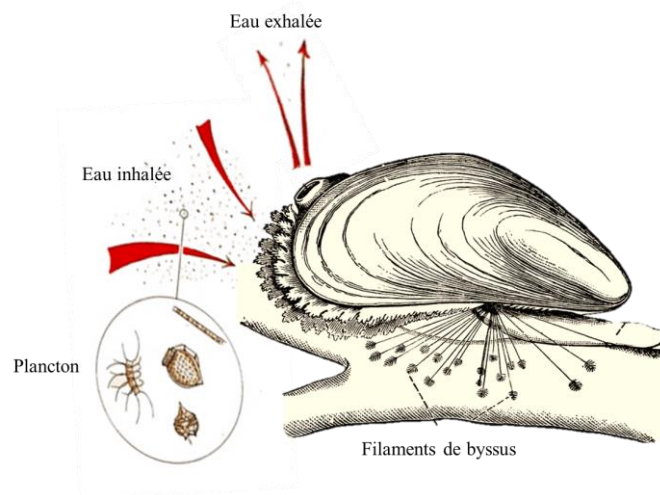


Figure 6. Processus de filtration chez *Mytilus edulis*

4. Reproduction et cycle de vie

La moule est sexuellement différenciée. Son cycle sexuel comprend quatre stades, allant du repos au cours duquel l'animal accumule des réserves, à la maturité sexuelle (**Figure 7**).

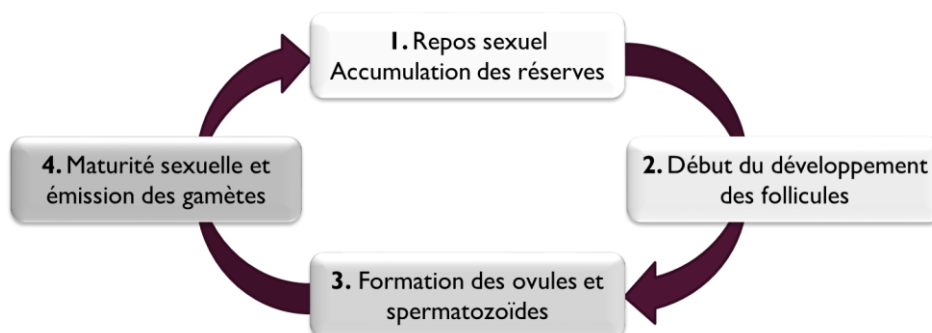


Figure 7. Stades de développement sexuel de *Mytilus edulis*

Les variations brusques du milieu telles que le changement de température provoquent une émission des gamètes en une ou plusieurs fois. Les spermatozoïdes libérés dans la colonne d'eau sont entraînés par la circulation d'eau entrante et vont à la rencontre des ovules dans la cavité palléale. Peu de temps après la fécondation, les embryons deviennent des larves trochophores qui nagent librement. Ces dernières se transforment en 24h en larves véligères caractérisées par une bouche fonctionnelle et un tube digestif. Les larves continuent à croître pendant 2 à 3 semaines. Une fois les pédivéligères entièrement développés, les pieds s'étendent et entrent en contact avec le substrat pour se fixer. Si le substrat est approprié, la larve se métamorphose alors dans la forme juvénile et fixe son byssus.

II. Défenses immunitaires de la moule bleue

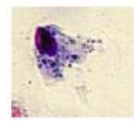
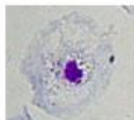
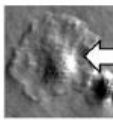
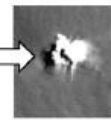
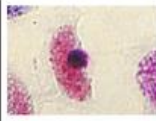
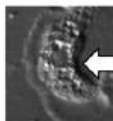
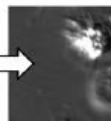
Comme tous les invertébrés, la moule bleue est dotée d'un système immunitaire exclusivement inné. Ce dernier utilise des cellules circulantes appelées hémocytes et une grande variété d'effecteurs moléculaires. Différents mécanismes cellulaires sont impliqués pour protéger l'animal des microorganismes envahisseurs comme la phagocytose, les réactions cytotoxiques incluant la libération des enzymes lysosomales, des peptides antimicrobiens et des radicaux libres. L'hémolymphe contient un faible taux de protéines incluant des lectines solubles, des enzymes lysosomales et une variété de peptides antimicrobiens.

1. L'immunité cellulaire

1.1. Les hémocytes

Chez les mollusques bivalves, les hémocytes sont considérés comme les effecteurs de défense contre les microbes. Ces cellules actives du système immunitaire sont capables de s'infiltrer dans les tissus afin de rejoindre le site d'infection. Elles participent également à diverses fonctions biologiques et physiologiques telles que la réparation de la coquille (Johnstone et al., 2008; Mount et al., 2004) et le transport des particules nutritives (Beninger et al., 2003). En observation microscopique, ces immunocytes forment une population hétérogène. Plusieurs classifications ont été proposées ces dernières années et souvent, deux principaux types cellulaires sont décrits: les cellules granulaires et les cellules agranulaires (Stefano, 1990). Le Foll et al. (2010) ont distingué trois groupes cellulaires chez *Mytilus edulis* à partir de critères cytochimiques, morphologiques et fonctionnels: des petits basophiles semi-granulés, des hyalinocytes agranulés et des éosinophiles granulocytes plus complexes. Le **Tableau 1** récapitule ces trois populations hémocytaires ainsi que leurs principales caractéristiques morphologiques.

Tableau 1. Récapitulatif des différentes populations des hémocytes de *Mytilus edulis* d'après Le Foll et al. (2010)

cell type		Approx. %	size ^a (µm)	granules ^b	Phagocytic capability ^c	Region ^d	Hemacolor appearance	HMC ^e appearance and types of motility	Notes
Sometimes regrouped as hyalinocytes*	basophils	20-25 %	7	Semi-granular basic	No	3		 Filopodia-based	Constitute the core of aggregates
	hyalinocytes	5-45 %	10	No granules phagosomes	Low	2		  Amoeboid Filopodia-based	
	eosinophilic granulocytes	35-65 %	10	Acidic granules phagosomes	High	1		  Amoeboid Filopodia-based	"Professional" phagocytes

Comme chez tous les autres bivalves, l'origine des hémocytes reste inconnue. Plusieurs hypothèses ont été émises sur la présence ou l'absence d'un tissu hématopoïétique et sur la différenciation des cellules. Certaines études supposent qu'elles proviennent de tissus diffus dans le manteau et les branchies (Smith, 2001) tandis que d'autres ont élaboré des modèles d'ontogenèse hémocytaire (Mix, 1976). Plus récemment, une étude effectuée chez l'huître *Crassostrea rhizophorae* a suggéré la provenance des hémocytes à partir d'un seul type cellulaire. D'après les auteurs, les différentes sous populations hémocytaires correspondent à plusieurs stades de maturation ou d'activité (Rebelo et al., 2013). Toutefois, l'absence de connaissances sur l'organe producteur et l'existence de lignées cellulaires indépendantes ne permet pas de vérifier ces hypothèses et conclure sur l'origine de ces cellules.

1.2. Les mécanismes de défense cellulaire

La fonction principale des hémocytes est d'assurer une protection contre les agents infectieux. En effet ces cellules actives du système immunitaire sont capables de reconnaître et éliminer les microbes à travers plusieurs activités cellulaires. Elles agissent en coordination avec les facteurs humoraux (détaillés dans le paragraphe 2) pour répondre aux attaques des envahisseurs. La phagocytose est le centre de la réponse immunitaire chez les vertébrés comme chez les invertébrés, toutefois d'autres mécanismes cellulaires peuvent intervenir comme l'encapsulation et l'apoptose (Figure 8).

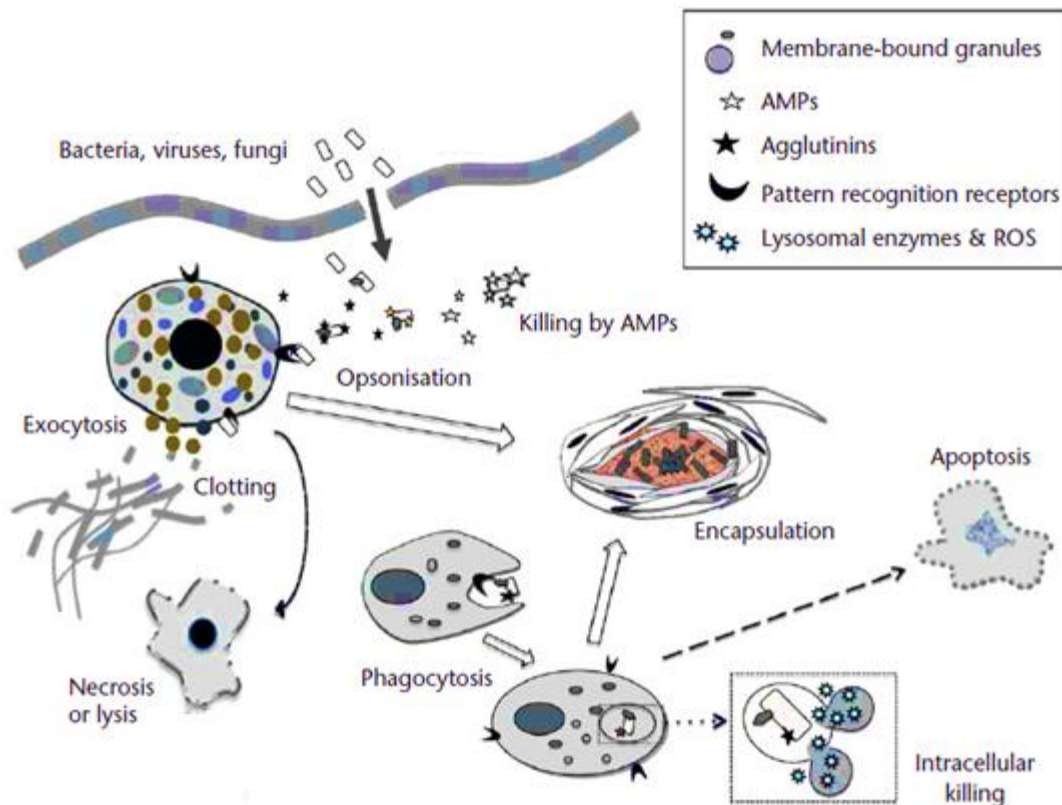


Figure 8. Représentation schématique des activités immunitaires cellulaires des invertébrés après une invasion par des microorganismes d'après [Smith \(2001\)](#)

1.2.1. La phagocytose

La phagocytose est le processus par lequel les cellules circulantes ou infiltrées ingèrent une ou plusieurs particules étrangères ([Smith, 2001](#)). Elle joue un rôle clé dans la réponse immunitaire mais elle est aussi impliquée dans le transport des nutriments chez les invertébrés. Les cellules en charge de la phagocytose sont appelées phagocytes. Elles peuvent être classées en deux groupes : les phagocytes professionnels qui sont exécuteurs à plein temps et les phagocytes occasionnels qui ont d'autres fonctions et ne participent au processus qu'en cas de besoin ([Nakanishi and Shiratsuchi, 2006](#)). Chez les invertébrés, le type et le nombre de phagocytes varie entre les espèces. Pour les hémocytes de la moule bleue, la phagocytose est principalement assurée par les granulocytes éosinophiles, avec 42% de cellules contenant 3 billes de latex ou plus après 2h de contact *in vitro* ([Le Foll et al., 2010](#)).

La phagocytose peut être divisée en quatre étapes. L'entrée des particules étrangères dans l'organisme stimule une réponse chimiotactique des hémocytes. Cette étape est suivie par l'adhésion et la reconnaissance des envahisseurs qui permet leur internalisation ou leur endocytose. Enfin, les particules étrangères sont éliminées par la phase de la digestion (**Figure 9**).

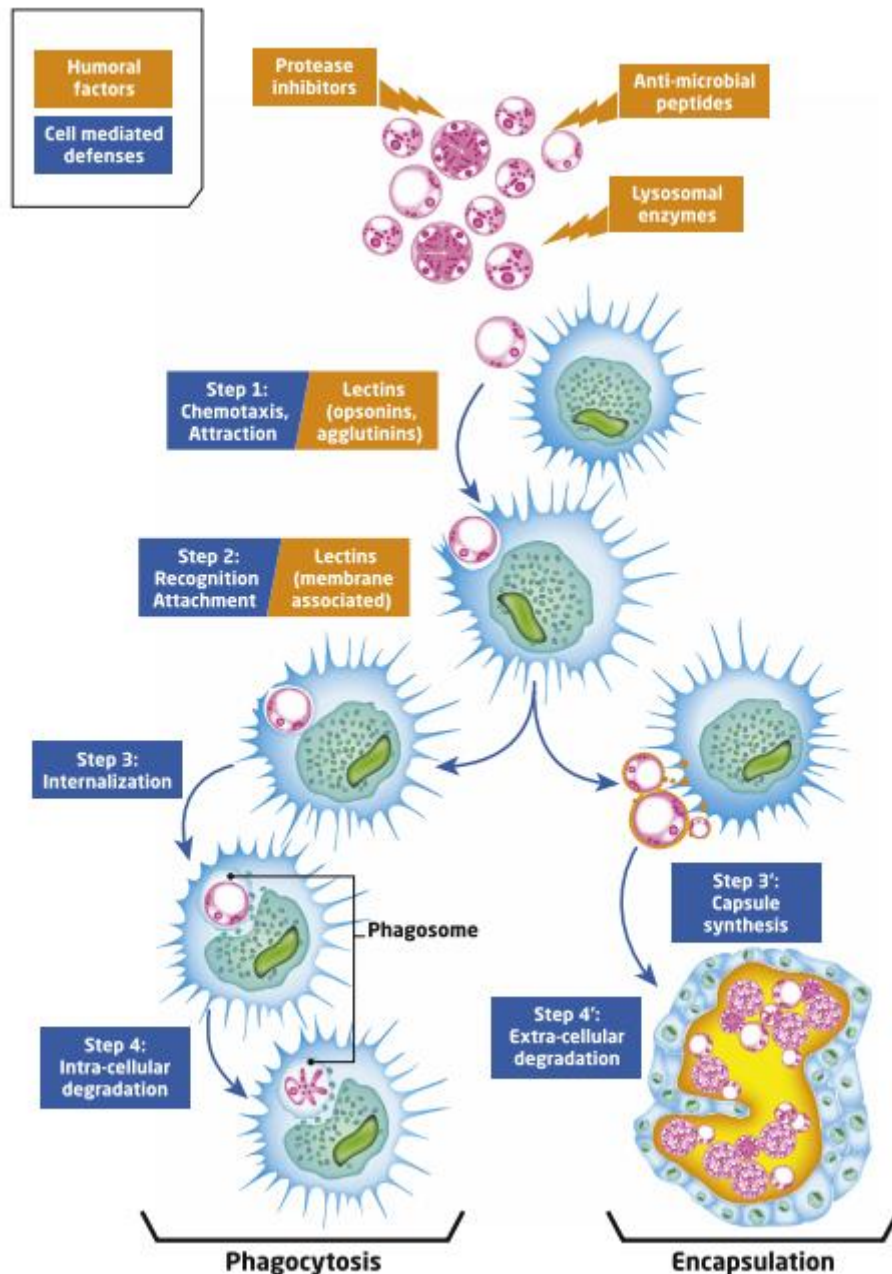


Figure 9. Représentation schématique des différents stades de la phagocytose et de l'encapsulation.

Les rectangles bleus représentent les différentes étapes de phagocytose ou d'encapsulation, les rectangles oranges représentent les facteurs humoraux intervenant à chaque étape (Soudant et al., 2013)

- **Le chimiotactisme**

Le chimiotactisme est le mouvement dirigé des cellules en gradient chimique (Cheng and Howland, 1979). Il est considéré comme étant la cause de leur accumulation dans les sites d'infection ou les tissus endommagés (Nelson et al., 1976). Il augmente la probabilité du contact physique entre les immunocytes et les envahisseurs et donc leur détection et élimination (Schneeweiss and Renwartz, 1993). Plusieurs études ont décrit le chimiotactisme des

neutrophiles chez les vertébrés ainsi que les substances attractives (Voir la revue de Smith and Lumsden, 1983) tandis que peu de données sont disponibles pour les mollusques bivalves.

Dans une récente étude, la motilité des hémocytes de *Mytilus edulis* a été caractérisée confirmant leur pouvoir de migration (Riout et al., 2013). L'activation de la migration des hémocytes par des bactéries ou leurs produits sécrétés a été également rapportée chez la moule et l'huitre (Alvarez et al., 1995; Cheng and Howland, 1979; Schneeweiss and Renwranz, 1993).

- **La reconnaissance des particules étrangères et l'attachement**

La phagocytose dépend de la capacité des immunocytes à reconnaître les particules étrangères. Pour ce fait, des motifs de reconnaissance appelés PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) sont exprimés à la surface des microorganismes pathogènes comme le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries gram négatif, le peptidoglycane des bactéries gram positif et le β -glucane des champignons (Smith, 2001). Les PAMPs sont reconnus par plusieurs récepteurs phagocytaires. Ces récepteurs sont soit représentés par des protéines solubles de l'hôte (PRPs - pattern recognition proteins), soit associés aux membranes cellulaires (PRRs - pattern recognition receptors). Parmi les récepteurs de surface cellulaires, on trouve chez les bivalves, les Toll-like (TLRs), les récepteurs de reconnaissance des peptidoglycanes (PGRPs) et les lectines.

Les **TLRs** constituent un des plus anciens composants du système immunitaire. Ce sont des protéines transmembranaires comportant 1) un domaine extracellulaire composé de nombreux motifs LRR (leucin-rich repeats) capable de lier une grande variété de PAMPs, 2) une région transmembranaire et 3) un domaine cytoplasmique Toll /IL-1R (TIR) conservé (Takeda et al., 2003). Des transcrits de TLRs ont été identifiés chez plusieurs espèces de bivalves comme l'huitre (Zhang et al., 2011), la moule (Tanguy et al., 2013a; Venier et al., 2011), la palourde (Mateo et al., 2010; Moreira et al., 2012) et d'autres (Qiu et al., 2007). Récemment, Toubiana et al. (2014) ont obtenu 15 séquences nucléotidiques complètes de TLRs chez *Mytilus galloprovincialis*, 11 transcrits chez *Mytilus edulis* et 21 transcrits chez *Crassostrea gigas*. De plus, l'injection de la moule méditerranéenne par des bactéries a induit une surexpression de certains gènes reliés au TLRs.

Les **PGRPs** sont des protéines ubiquitaires qu'on retrouve chez la plupart des animaux incluant les vertébrés, les échinodermes et les mollusques. Elles reconnaissent les bactéries à travers le composant majeur de la paroi cellulaire ; le peptidoglycane (Dziarski and Gupta, 2006). Chez les bivalves, les PGRPs ont été identifiés chez le pétoncle *A. irradians*, les

palourdes *R. philippinarum* et *S. grandis* ainsi que chez l'huitre *C. gigas* (Itoh and Takahashi, 2008; Moreira et al., 2012; Ni et al., 2007; Wei et al., 2012). Un transcrit homologue à PGRP S1S de l'huitre creuse a été également identifié chez *Mytilus edulis* (Tanguy et al., 2013a).

Les **lectines** sont les PRRs les plus connus chez les mollusques bivalves. Ce sont des glycoprotéines synthétisées et secrétées par les hémocytes, capables de se lier à la surface des microorganismes, avec un large spectre de reconnaissance. Ces molécules jouent un rôle important dans la reconnaissance du pathogène, la transduction du signal ainsi que l'adhésion cellulaire et l'inflammation (Kilpatrick, 2002). Elles possèdent des propriétés d'agglutination et d'opsonisation qui ont été mises en évidence chez les bivalves (Chatterjee and Adhya, 2013). Par exemple, une activité d'agglutination plus importante a été décrite chez une population résistante de *C. gigas* en comparaison avec la population sensible de *C. virginica* (La Peyre et al., 1995). De plus, Romestand et al. (2002) ont rapporté l'augmentation de cette activité chez les mêmes espèces après exposition au parasite *P. marinus*.

Différents types de lectines incluant les lectine type C, lectine liant l'acide sialique, la fucolectine et la galectine ont été caractérisées chez la moule méditerranéenne (Venier et al., 2009, 2011). Dans une récente étude, Tanguy et al. (2013a) ont identifié dans les hémocytes de la moule bleue 4 transcrits homologues à la galectine et 34 homologues aux FREPs (Fibrinogen-related protein). Les galectines sont caractérisées par une séquence conservée dans leur domaine carbohydrate de reconnaissance et une affinité spécifique pour les β -galactosides (Vasta, 2012), tandis que les FREPs sont dotés d'un domaine fibrinogène-like (FBG) dans la partie C-terminale mais qui diffèrent dans la région N-terminale (Romero et al., 2011).

- **L'internalisation ou l'endocytose**

L'internalisation est un processus séquentiel qui implique plusieurs molécules incluant des récepteurs, des transducteurs de signal et le cytosquelette. Le mécanisme est initié après la liaison des particules étrangères au récepteur phagocytaire spécifique ce qui active les voies de signalisation menant au réarrangement de l'actine cytosquelettique. Par conséquent, les pseudopodes sont étendus au point du contact, pour entourer la particule et l'enfermer dans des vésicules appelées vacuoles endocytiques ou phagosomes primaires.

L'enveloppement des cellules cibles par les plis membranaires des hémocytes a été décrit chez les bivalves (Cheng, 1975; Stefano, 1990). D'autres études ont également rapporté un autre mode d'ingestion. Par exemple, chez l'huitre creuse et la moule bleue, les hémocytes sont capables d'étendre un unique pseudopode en forme de cône qui engloutit le microenvahisseur

(Renwrandt et al., 1979; Stefano, 1990). Il a été suggéré que le mode d'internalisation varie en fonction des récepteurs responsables de l'induction de la phagocytose mais aussi en fonction de la taille et la forme des particules visées (Champion and Mitragotri, 2006).

- **La digestion**

Après l'internalisation, le phagosome subit rapidement une série de transformations résultant de son interaction avec des sous compartiments de la voie endocytyque (granules et lysosomes). En effet, des évènements de fission et de fusion avec différentes vésicules intracellulaires lui permettent l'acquisition de caractéristiques de dégradation propres aux lysosomes. Ainsi, après maturation, le phagosome acquiert un milieu acide contenant des enzymes protéolytiques lui permettant de détruire les particules ingérées (Russell, 2001). Différentes activités enzymatiques hydrolytiques libérées dans le phagolysosome ont été identifiées chez les bivalves, telles que les β -glucuronidases, les phosphatases alcalines et acides, le lysozyme, les lipases, les arylsulphatases et les estérases non spécifiques (Carballal et al., 1997a; Wootton et al., 2003).

En plus de ces activités hydrolytiques, les hémocytes possèdent des activités microbicides dépendantes de l'oxygène, assurées par les espèces oxygénées réactives (EOR). Ces dernières peuvent être naturellement générées, comme une partie du métabolisme basal des hémocytes, mais aussi en réponse aux stimuli endogène ou exogène (Donaghy et al., 2015). Les EOR ont plusieurs sources cellulaires. Elles peuvent être produites à l'extérieur de la membrane cytoplasmique ou à l'intérieur de la cellule dans les mitochondries, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes ou encore dans la vésicule phagocytyque. La génération des EOR dans la mitochondrie a été démontrée chez plusieurs espèces de bivalves notamment dans les hémocytes de *C. gigas* en absence de stimulation (Donaghy et al., 2012). Tandis que peu de données sont disponibles pour l'implication du réticulum endoplasmique et des peroxysomes dans la synthèse de ces radicaux libres (Donaghy et al., 2015).

La voie de synthèse des EOR la plus connue résulte de l'activation de l'enzyme appelée NADPH oxydase (Geiszt and Leto, 2004; Underhill and Ozinsky, 2002) qui libère l'anion superoxyde (O_2^-) (Figure 10). Ensuite, la superoxydase dismutase (SOD) catalyse la production du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à partir de l' O_2 . Le H_2O_2 peut à son tour réagir avec O_2^- pour générer des radicaux hydroxyles (OH^-) et des singulets d'oxygène (1O_2) fortement réactifs. De plus, H_2O_2 peut être converti en acide hypochloreux et chloramines par les myeloperoxydases. Ainsi les EOR sont composées de superoxyde et de peroxyde avec des activités microbicides.

Les mécanismes oxydatifs ont été décrits chez plusieurs espèces de bivalves souvent après exposition à des stimulateurs chimiques (PMA) ou biologiques (zymosan, bactéries, produits bactériens). On peut citer les exemples suivants : chez les huîtres *C. virginica*, *C. gigas* (Goedken and De Guise, 2004; Labreuche et al., 2006; Lambert et al., 2003), les moules *M. edulis* et *M. galloprovincialis* (Carballal et al., 1997b; Ordás et al., 2000; Pipe, 1992) et la coquille saint jacques *P. maximus* (Le Gall et al., 1991).

Parmi les radicaux toxiques, on retrouve également des espèces nitriques réactives (ENR). Elles agissent en synergie avec les EOR dans les phagosomes où elles exercent des effets toxiques sur les microorganismes internalisés (Fang, 2004). Leur production débute avec la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) par la NO synthase (NOS) à partir de l'arginine. Le NO peut réagir avec l'anion superoxyde et générer du peroxynitrite (ONOO⁻), composé au fort pouvoir microbicide. Les hémocytes de bivalves sont capables de produire du NO en réponse à des stimuli immunitaire (Gourdon et al., 2001; Novas et al., 2004; Tafalla et al., 2003; Villamil et al., 2007).

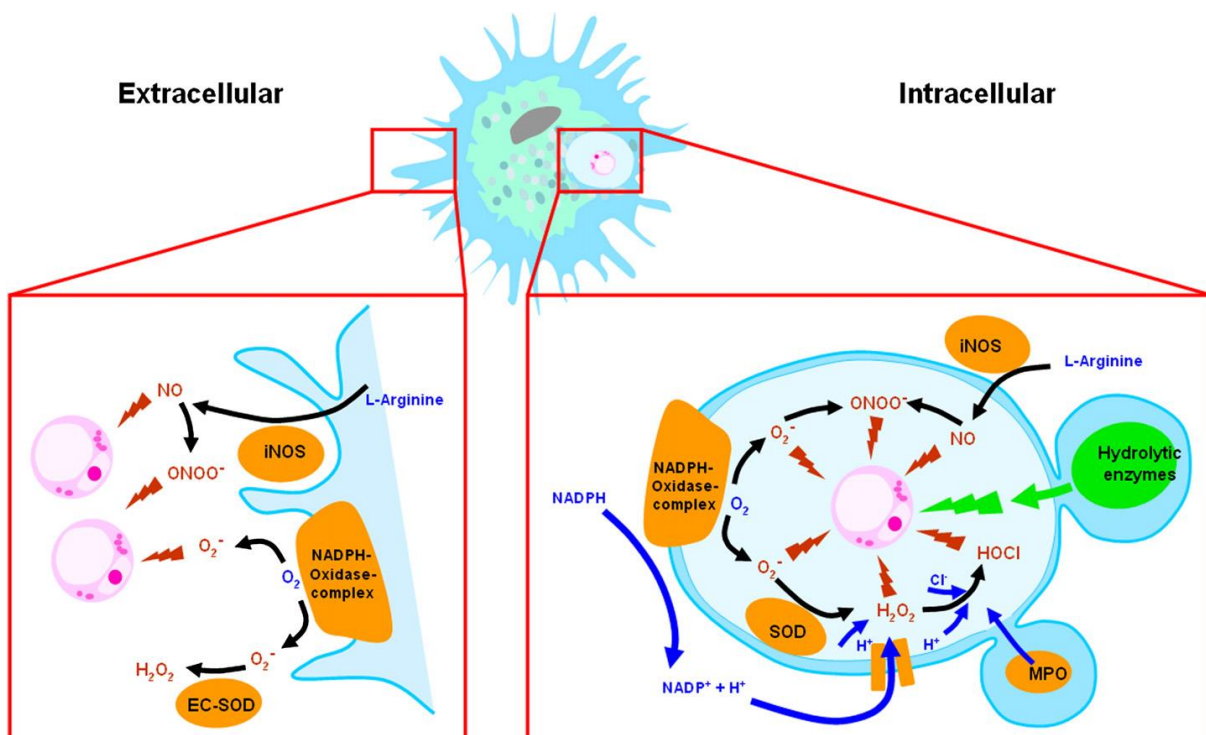


Figure 10. Les différentes voies impliquées dans la production des EOR et ENR par les hémocytes de bivalves

En dehors de la voie mitochondriale, les principales espèces réactives de l'oxygène dans les hémocytes des mollusques bivalves peuvent être produites à l'extérieur de la membrane cellulaire (à gauche) ou à l'intérieur du phagosome (à droite). Les enzymes sont notées en orange et les EOR et ENR en rouge. NO, oxyde nitrique; ONOO⁻, peroxynitrite; O₂⁻, superoxyde; H₂O₂, peroxyde d'hydrogène; HOCl, hypochlorite; NOS, oxyde nitrique synthase; SOD, superoxyde dismutase; MPO, myeloperoxidase (Soudant 2008)

1.2.2. L'encapsulation

L'encapsulation est la deuxième réponse immunitaire majeure des invertébrés contre les microorganismes et plus particulièrement contre les protozoaires. Elle est connue chez les bivalves comme la palourde commune ou la palourde japonaise infectées par les différentes espèces du parasite *Perkinsus* (Montes et al., 1995, 1997). Toutefois les processus moléculaires impliqués restent peu documentés. Quelques avancées ont été effectuées à travers le modèle du mollusque gastéropode *Biomphalaria glabrata* infecté par les trématodes *Schistosoma mansoni* (Van der Knaap and Loker, 1990).

Selon Cheng and Rifkin (1970) ce mécanisme observé chez les bivalves représente une tentative de phagocytose interrompue lorsque la cible est trop grande pour être ingérée. La réponse est initiée par la libération des molécules d'adhésion par les granulocytes suite à la reconnaissance des particules cibles (Johansson et al., 1995). Ceci engendre le regroupement des cellules hématocytaires qui s'organisent en couches concentriques afin de former une capsule fine autour du parasite (Figure 9). La structure est mélanisée à travers l'activité de l'enzyme phénoloxydase fixée à la surface des hémocytes (Söderhäll et al., 1994) et le parasite est détruit grâce aux enzymes lysosomales et les EOR générées par les hémocytes (Soudant et al., 2013).

1.2.3. La mort cellulaire programmée

La mort cellulaire programmée regroupe un ensemble de processus cellulaires qui en réponse à certains signaux spécifiques conduit à exécuter un programme génétique aboutissant à la mort cellulaire. Elle permet notamment la destruction des cellules malades ou chimiquement endommagées sans libérer les composés cellulaires ou les agents infectieux qui peuvent menacer l'hôte. L'apoptose est une des catégories de la mort cellulaire programmée. Ce mécanisme utilise la propre énergie de la cellule et son contrôle génétique contrairement aux cellules nécrotiques. Morphologiquement, les cellules apoptotiques subissent des transformations comme le bourgeonnement des membranes et une condensation de la chromatine avec une fragmentation de l'ADN (Kim and Sharma, 2004). Une fois les cellules mortes, leur contenu est enfermé dans des vésicules connues comme les corps apoptotiques qui sont détruits par les phagocytes (Elmore, 2007).

L'apoptose est une des principales réponses face à une infection virale (Renault et al., 2000), en empêchant ainsi la dissémination des pathogènes dans l'organisme. Divers travaux ont permis de démontrer son existence chez *Ruditapes philippinarum*, *Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas* (Lacoste et al., 2002; Renault et al., 2000).

2. L'immunité humorale

Plusieurs molécules biologiquement actives ont été décrites dans l'hémolymphe des bivalves. Elles sont généralement classifiées en deux catégories : les biomolécules sérologiquement actives (opsonines, lysines, agglutines, facteurs antimicrobiens, lysozymes) et les enzymes d'origine lysosomale (aminopeptidases, β -glucuronidases, acide phosphatase, alcaline phosphatase, α -mannosidase, estérases et peroxydases).

Les mécanismes moléculaires d'action précis sont seulement connus pour certains facteurs humoraux, malgré l'importance de leur rôle en tant qu'agents bactériolytiques et bactériostatiques (Gestal et al., 2008).

2.1. Cascade de la prophénoloxydase

Le système de la prophénoloxydase joue un rôle crucial dans l'immunité innée. Il repose sur une métalloprotéine à cuivre, la phénoloxydase (PO), responsable de la production de mélanine. En réponse à la présence de microorganismes, la pro-protéine est clivée spécifiquement par une serine protéase endogène (Söderhäll et al., 1994). Sous sa forme active, la PO catalyse la réaction de conversion de phénols en quinones, qui forment par polymérisation la mélanine, et des composés intermédiaires bactéricides comme l'o-quinone (Coles and Pipe, 1994; Söderhäll and Cerenius, 1998).

L'activité de la PO a été mise en évidence dans les hémocytes et l'hémolymphe des bivalves comme *M. edulis* (Coles and Pipe, 1994), *Perna viridis* (Asokan et al., 1997) et *C. gigas* (Hellio et al., 2007). Butt and Raftos (2008) ont décrit la mélanisation des hémocytes de l'huître *Saccostrea glomerata* sous l'action de la PO, après ingestion du parasite *Marteilia sydneyi* (Figure 11).



Figure 11. Formation de la mélanine sous l'action de la PO après phagocytose de sporonts de *Marteilia sydneyi* par les hémocytes de *Saccostrea glomerata*. A : La mélanisation débute autour des sporonts phagocytés. B : Phagosome totalement mélanisé. Barre = 5µm (Butt and Raftos, 2008).

2.2. Enzymes lysosomales hydrolytiques

Chez les mollusques bivalves, une grande variété d'enzymes lysosomales a été identifiée dans les hémocytes et le sérum (**Tableau 2**). Ces hydrolases sont responsables de la dégradation des agents infectieux réalisée à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules ([Xue and Renault, 2000](#)). Elles sont induites par exposition aux bactéries ou à leurs composants structuraux ([Cheng, 1986](#); [Oubella et al., 1994](#)).

Tableau 2. Exemples d'enzymes lysosomales chez les mollusques bivalves

Enzymes	Activité biologique	Espèces	Référence
Lysozyme	Lyse bactéries Gram +	<i>Mercenaria mercenaria</i> <i>Mytilus edulis</i>	Cheng, 1975 Pipe, 1990
Aminopeptidase	Exopeptidase	<i>Mytilus edulis</i> <i>Ruditapes philippinarum</i>	Renwraantz and Lam, 2010 Oubella et al., 1994
β glucuronidase	Hydrolyse des mucopolysaccharides	<i>Mercenaria mercenaria</i> <i>Mytilus edulis</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Moore and Gelder, 1985 Pipe, 1990 Carballal et al., 1997a
Phosphatase acide	Dégradation intracellulaire des particules étrangères	<i>Mya arenaria</i> <i>Mytilus edulis</i>	Huffman and Tripp, 1982 Moore and Lowe, 1977
α mannosidase	Dégradation intracellulaire des particules étrangères	<i>Crassostrea gigas</i>	Cheng, 1992
Estérase	Dégradation intracellulaire des particules étrangères	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Feng et al., 1971 Carballal et al., 1997a
Peroxydase	Dégradation intracellulaire des particules étrangères	<i>Mytilus edulis</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Renwraantz et al., 1996 Torreilles et al., 1997

2.3. Inhibiteurs de protéases

Les inhibiteurs de protéases sont des protéines qui régulent l'activité catalytique des protéases. Ils protègent l'hôte de l'activation excessive de cascades protéolytiques endogènes générant des produits toxiques qui peuvent endommager les tissus ([Hibbetts et al., 1999](#)). Ils luttent également contre les protéases produites par les organismes pathogènes en tant que facteurs de virulence ([Oliver et al., 1999](#); [Tall et al., 1999](#)). Parmi ces protéines, on distingue les inhibiteurs spécifiques d'une classe de protéases comme les serpins (inhibiteurs de serine protéase) et les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP) (pour revue, voir [Brew and Nagase, 2010](#)). Elles ont été identifiées chez les bivalves comme les huîtres *C. gigas* ([Gueguen et al., 2003](#); [Montagnani et al., 2007](#)) et *C. virginica* ([Faisal et al., 1998](#); [Xue et al., 2009](#)) ainsi que la moule *Mytilus galloprovincialis* ([Venier et al., 2011](#)).

Certaines études ont démontré leur rôle dans la lutte contre les pathogènes. Par exemple, [Montagnani et al. \(2007\)](#) ont rapporté l'expression de la Cg-Timp (*Crassostrea gigas* Tissue Inhibitor of Metalloprotease) dans les hémocytes en réponse à des injections bactériennes et de produits extracellulaires bactériens (ECPs). L'inhibition de la perkinsine, protéase extracellulaire majoritaire du protozoaire parasite de l'huître *Perkinsus marinus* par la sérine protéase de *C. virginica* cvSI-2 a été également démontrée ([Xue et al., 2009](#)).

2.4. Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont parmi les plus importants effecteurs de défense immunitaire. Répandus dans l'ensemble du monde vivant, on peut les retrouver chez les plantes, les animaux et même les bactéries (voir revue [Boman, 1995](#)). Ils jouent des rôles complexes et multifonctionnels dans l'immunité allant de la destruction des microorganismes jusqu'à l'immunomodulation sélective des effets sur l'hôte ([Ganz, 2003](#); [Yeaman and Yount, 2003](#)). Ils sont synthétisés dans les granulocytes même en absence de menace ; toutefois la présence des bactéries induit une augmentation de leur concentration dans l'hémolymphe ([Hubert et al., 1997](#); [Mitta et al., 1999b](#)). Différents peptides sont engagés dans la destruction des bactéries dans les phagocytes avant leur libération dans l'hémolymphe pour participer aux réponses systémiques ([Mitta et al., 2000a, 2000b](#)).

Une grande diversité de peptides antimicrobiens a été révélée chez les espèces de moules. Des peptides similaires aux **défensines** des arthropodes ont été purifiés de l'hémolymphe de *M. edulis* et *M. galloprovincialis* ([Charlet et al., 1996](#); [Hubert et al., 1996](#)). Dans les années suivantes, d'autres AMPs ont été caractérisés : les **mytilines** ([Mitta et al., 2000a](#)), les **myticines** ([Mitta et al., 1999a](#)) et les **mytimycines** à activité strictement antifongique ([Cantet et al., 2012](#); [Charlet et al., 1996](#); [Sonthi et al., 2012](#)). Récemment, des nouvelles classes d'AMPs ont été découvertes soit par analyse des données de séquençage comme pour les **mytimacines** et les **big défensines** chez *M. galloprovincialis* ([Gerdol et al., 2012](#)), soit par clonage des séquences nucléotidiques obtenus des ARNm comme pour les **myticusines** chez *M. coruscus* ([Liao et al., 2013](#)). Toutefois l'action de ces dernières familles reste à explorer.

III. Pathologies

Durant les dernières décennies, les maladies touchant les mollusques bivalves se sont multipliées et plusieurs agents infectieux ont été décrits incluant des bactéries, des protozoaires et des virus (Le **Tableau 3** en récence une partie).

- **Pathologies des moules**

Divers organismes pathogènes ont été associés avec les espèces de mytilidés particulièrement dans un contexte de mortalités. Le copépode parasite *Mytilicola intestinalis* a causé d'importantes pertes dans la production mytilicole française en Charente Maritime et en Vendée au début des années soixante (Brienne, 1960, 1964). *Polydora ciliata* a également engendré de fortes mortalités en France. Cet annélide polychète se fixe sur les moulières de larves en quantités importantes formant une « couverture » qui gêne l'alimentation des mollusques (Ropert and Olivési, 2002). Plus récemment, des microorganismes ont été décrits comme agents infectieux des moules. Par exemple, Jones et al. (1996) ont associé les mortalités de *Perna canaliculus* et *Mytilus galloprovincialis* avec la présence de virus. De même, la virulence de deux isolats affiliés à *V. splendidus* et *V. coralliilyticus/ neptunius-like* a été démontrée envers les larves de *Perna canaliculus* (Kesarcodi-Watson et al., 2009).

Tableau 3. Exemples de maladies et d'agents pathogènes affectant les bivalves

	Agents responsables	Maladies	Espèces affectées	Références
Champignon	<i>Ostracoblabe implexa</i>	Maladie de la coquille	<i>O. edulis</i> , <i>C. angulata</i> <i>C. gigas</i>	Alderman, 1985; Pirkova and Demenko, 2008
Protozoaires	<i>Perkinsus marinus</i>	Maladie "Dermo"	<i>C. virginica</i>	Soniat, 1996
	<i>Perkinsus olseni</i>		<i>R. philippinarum</i> , <i>R. decussatus</i>	El Bour et al., 2012
	<i>Haplosporidium costale</i> <i>Haplosporidium nelsoni</i>	SSO (seaside organism) MSX (multi-nucleated unknown)	<i>C. virginica</i> , <i>C. gigas</i>	Burreson and Ford, 2004; Wang et al., 2010
	<i>Bonamia ostreae</i>	Microcell disease	<i>O. edulis</i>	Banning, 1982
	<i>Marteilla refringens</i>	Maladie de la glande digestive	<i>O. edulis</i>	Grizel et al., 1974
	<i>Marteilla sydneyi</i>	QX (Queensland Unknown) disease	<i>S. glomerata</i>	Butt and Raftos, 2008
Virus	<i>Iridovirus</i>	Maladie des branchies OVVD (Oyster Velar Virus Disease)	<i>C. angulata</i> , <i>C. gigas</i>	Comps, 1983; Elston and Wilkinson, 1985
	<i>Herpès Virus</i>		<i>C. gigas</i> , <i>O. edulis</i> , <i>R. philippinarum</i> , <i>P. maximus</i>	Arzul et al., 2001; Renault et al., 2001
	Petits virus		<i>P. canaliculus</i> , <i>M. galloprovincialis</i>	Jones et al., 1996
Bactéries	<i>Rickettsia</i>		<i>C. chione</i> , <i>C. ariakensis</i> , <i>T. granosa</i>	Delgado et al., 2007; Wu and Pan, 2000; Zhu et al., 2012
	<i>Nocardia crassostreae</i>		<i>C. gigas</i>	Friedman and Hedrick, 1991
	<i>Roseovarius crassostreae</i>	JOD (juvenile oyster disease)	<i>C. virginica</i>	Boettcher et al., 2005
	Groupe <i>V. Splendidus</i>		<i>P. maximus</i> , <i>C. gigas</i> , <i>P. canaliculus</i> , <i>O. edulis</i>	Kesarcodi-Watson et al., 2009; Nicolas et al., 1996; Saulnier et al., 2010; Thompson et al., 2003
	<i>V. tubiashii</i>		<i>C. gigas</i>	Travers et al., 2014
	<i>V. tapetis</i>	BRD (Brown Ring Disease)	<i>R. philippinarum</i>	Allam et al., 2002
	<i>V. coralliilyticus</i>		<i>C. giga</i> , <i>P. canaliculus</i>	Genard et al., 2013; Kesarcodi-Watson et al., 2009
	<i>V. aestuarianus</i>		<i>C. gigas</i>	Garnier et al., 2007

IV. Les bactéries du genre *Vibrio*

1. Caractéristiques phénotypiques, écologiques et taxonomiques

1.1. Caractéristiques phénotypiques

Les *Vibrio* sont des bacilles Gram négatif, de 2 à 3 µm de long, en forme de bâtonnet incurvé. Ces bactéries typiquement aquatiques sont aérobies-anaérobies facultatives, mésophiles et chimio-organotrophes. Elles sont le plus souvent oxydase positive et nitrate réductase positive. Elles sont cultivées sur des milieux gélosés type « Marine agar » et « Luria Bertani agar » additionné de 1 à 3% de sel. Elles peuvent également pousser sur le milieu sélectif TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile Saltsucrose agar) où elles forment des colonies vertes (couleur du milieu) ou jaunes pour les bactéries capables d'utiliser le sucrose (**Figure 12**).

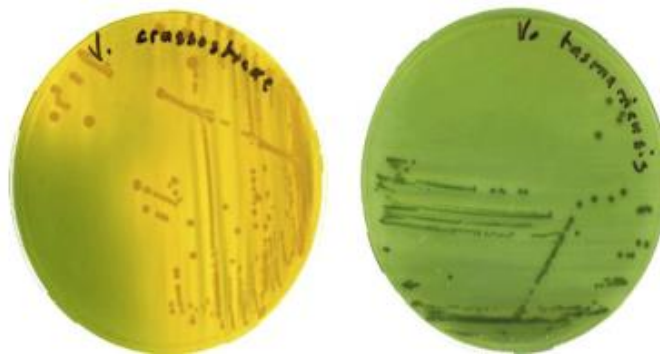


Figure 12. Diversité phénotypique de deux souches³ appartenant au groupe *Vibrio Splendidus* (*V. crassostreae* et *V. tasmaniensis*) sur le milieu TCBS: (Travers et al., 2015)

Les vibrions sont caractérisés par une grande motilité. (**Figure 13**). Ils se déplacent dans les milieux liquides en « swimming » grâce à leurs flagelles polaires et dans les milieux solides en « swarming » via leurs flagelles latéraux (McCarter, 1999). Ils peuvent également avoir une motilité de type « twitching » générée par l'ancrage et les rétractions du pilus sur une surface solide (Wall and Kaiser, 1999; Watnick and Kolter, 1999).

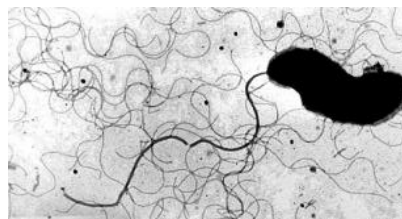


Figure 13. Micrographie de *Vibrio pectenicida* souche A365T sur milieu solide montrant les flagelles polaires et latéraux (×14000) obtenue en microscopie électronique à transmission (Lambert, 1998)

³ Une souche est un ensemble d'une espèce bactérienne, différente des autres bactéries de la même espèce par des différences mineures mais identifiables.

1.2. Caractéristiques écologiques

Les *Vibrio* sont des bactéries aquatiques qu'on retrouve aussi bien dans l'eau douce que dans les habitats aquatiques salés tels que les eaux côtières, les estuaires et les infrastructures aquacoles. Ils jouent un rôle important dans la biodégradation, la régénération des nutriments et le cycle biogéochimique. Certaines espèces sont plus communes dans l'eau douce toutefois elles peuvent être transportées dans les environnements salés par le courant d'eau (Tantillo et al., 2004). Ces bactéries vivent sous forme libre ou en formant des biofilms qui sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice polymérique et attachés à une surface biotique ou abiotique (Tremblay et al., 2014). Ils peuvent également vivre en colonisant des animaux. En effet, plusieurs espèces ont été associées à des organismes marins comme les coraux (Rosenberg and Ben-Haim, 2002), les poissons (Frans et al., 2011), les mollusques (Travers et al., 2014), les algues (Lee et al., 2016), les crevettes (Gopal et al., 2005) et le zooplancton (Heidelberg et al., 2002).

Le changement des paramètres de l'écosystème aquatique peut être critique à la survie et à la colonisation des bactéries. Parmi les facteurs environnementaux, la salinité, la disponibilité des nutriments et la température agissent sur l'abondance et la distribution des *Vibrio*. Par exemple, une température comprise entre 20 et 30°C augmente considérablement le nombre de bactéries (Kim et al., 2012; Randa et al., 2004). Pour s'adapter aux conditions environnementales hostiles, les *Vibrio* forment des biofilms (Yildiz and Visick, 2009). Ce mode de vie favorise la croissance des communautés bactériennes en donnant accès aux nutriments et les protège aussi des prédateurs et des substances antimicrobiennes (Donlan and Costerton, 2002).

Un autre moyen de survie des vibrions dans l'environnement est l'état « viable non cultivable » (VBNC) (Nilsson et al., 1991; Zhong et al., 2009). Dans cet état, les bactéries sont métaboliquement actives mais elles ne forment pas de colonies quand elles sont étalées sur un milieu de culture conventionnel. Le passage à l'état de VBNC peut s'accompagner de modifications morphologiques comme la réduction de la taille des cellules observée pour des souches de *V. cholerae* (Chaiyanan et al., 2007).

1.3. Taxonomie

Les *Vibrio* appartiennent à la famille des *Vibrionaceae* et à la classe des *gamma proteobacteria*. Regroupant aujourd'hui plus de 130 espèces, ce genre est reconnu comme étant

un des groupes les plus diversifié des bactéries aquatiques hétérotrophes (Gomez-Gil et al., 2014, <http://www.bacterio.net/vibrio.html#r>).

Dans la taxonomie traditionnelle, l'identification des espèces est fondée sur des caractères phénotypiques d'ordre morphologique (coloration Gram, colonie, incurvation, présence de flagelle, etc...) ou biochimique (source de carbone, tolérance au sel, activité enzymatique, etc...) (Alsina and Blanch, 1994). Toutefois, face à la grande variabilité et au nombre croissant des nouvelles espèces, des méthodes d'identifications moléculaires se sont avérées nécessaires. Aujourd'hui les taxonomistes privilégient une approche polyphasique, c'est-à-dire reposant sur une synthèse des résultats obtenus à partir de plusieurs techniques comme l'hybridation ADN/ADN, le séquençage de l'ARNr 16S ou la MLST⁴ et le phénotypage. La combinaison de ces outils a permis de mettre en évidence la nature polyphylétique des vibrions (Thompson et al., 2004). Dans une récente étude, Sawabe et al. (2013) ont différencié de nouveaux groupes en se basant sur l'analyse de séquences multilocus (MLSA). Le pourcentage de similarité des séquences de 8 marqueurs génomiques (*gapA*, *gyrB*, *ftsZ*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA* et *topA*) a permis de distinguer 23 groupes au sein de 96 espèces identifiées (**Figure 14**). Le groupe *V. Splendidus* semble être le plus polyphylétique, il regroupe 16 espèces isolées dans la plupart des cas à partir de mollusques bivalves (Travers et al., 2015).

⁴ MLST ou « Multilocus sequence typing » est une technique de typage qui examine les séquences nucléotidiques de plusieurs locus codant des gènes de ménage.

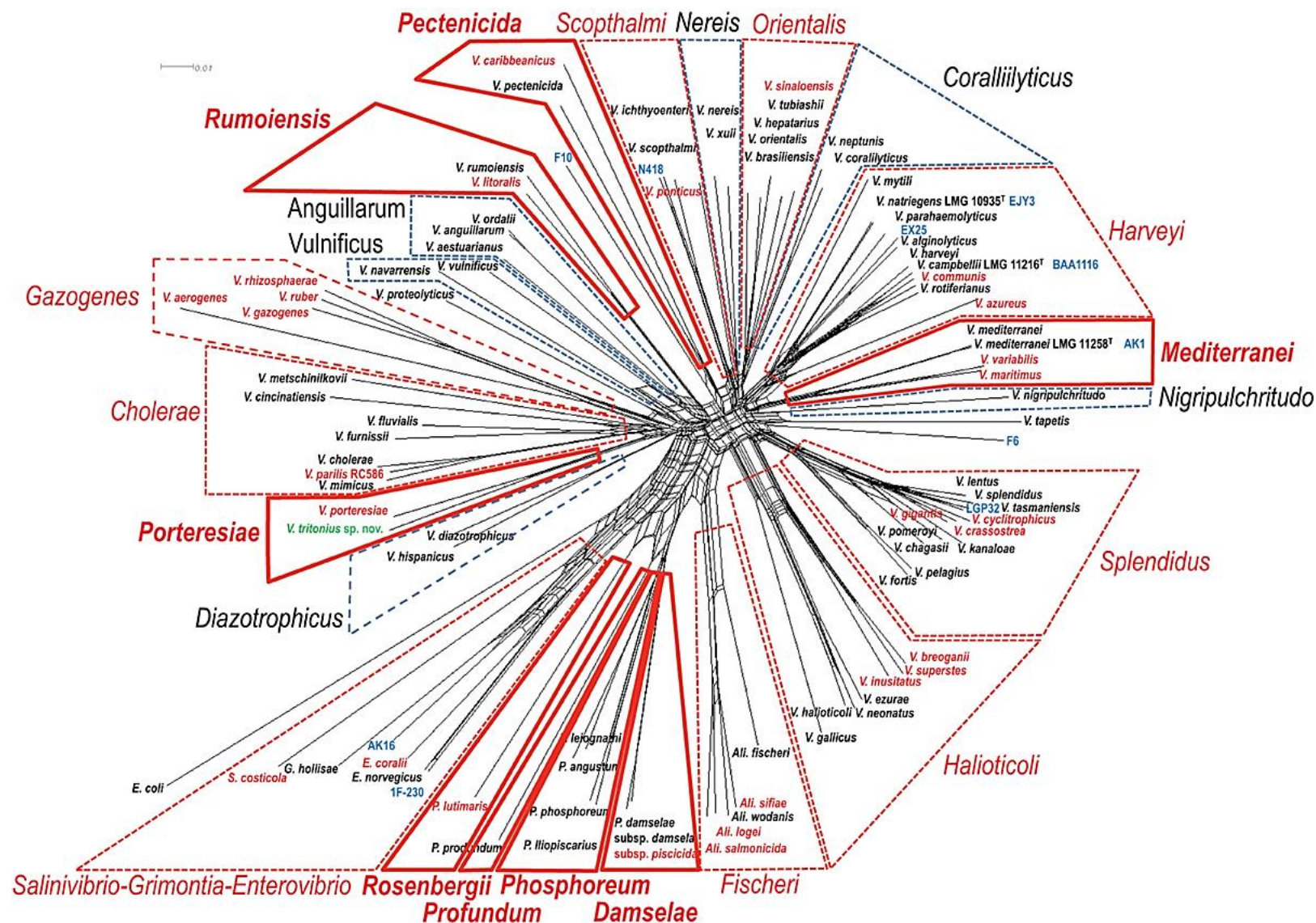


Figure 14. Arbre phylogénétique fondé sur le séquençage de huit gènes de référence (*gapA*, *gyrB*, *ftsZ*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*, et *topA*) des 96 espèces de *Vibrio*. Les nouveaux groupes sont indiqués en trait plein rouge et les lignes pointillées en rouge ou noir indiquent respectivement les groupes changés ou inchangés (Sawabe et al., 2013)

2. Pouvoir pathogène

Les bactéries peuvent être classées selon leur pouvoir pathogène qui représente leur capacité potentielle à produire une maladie (Casadevall and Pirofski, 1999). Ces microorganismes regroupent différentes catégories incluant des commensales avirulentes, des opportunistes qui peuvent causer des dommages en cas d'affaiblissement de l'hôte et des pathogènes virulentes en toutes circonstances. Le groupe de *Vibrio* contient aussi bien des bactéries symbiotiques que des pathogènes pour l'Homme ou les organismes marins comme les poissons, les crustacés et les mollusques.

2.1. Les vibrions pathogènes pour l'Homme

Une douzaine d'espèces de *Vibrio* est connue pour sa pathogénicité envers l'Homme dont les plus dangereuses *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, et *V. vulnificus*. Ces bactéries peuvent infecter leur hôte soit 1) par voie orale après ingestion d'aliments ou d'eau contaminée par des excréments humains ou eaux usées ou encore des fruits de mer et poisson crus, soit 2) par voie cutanée en exposant des coupures ou blessures ouvertes à l'environnement aquatique et les animaux marins (Lee and Younger, 2002; Toti et al., 1996; West, 1989). Les infections causées par les *Vibrio* peuvent être divisées en trois principaux syndromes cliniques : septicémie primaire, gastroentérite et infections des plaies. Le **Tableau 4** énumère les différentes espèces pathogènes pour l'Homme et leur association avec les syndromes cliniques.

Tableau 4. Association des espèces de *Vibrio* pathogènes avec les syndromes cliniques (Tantillo et al., 2004)

Espèces de <i>Vibrio</i>	Septicémie primaire	Gastroentérite	Infection des plaies
<i>V. cholerae</i> O1	*	+++	+
<i>V. cholerae</i> non-O1	+	+++	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	+++	++
<i>V. vulnificus</i>	+++	++	+++
<i>V. fluvialis</i>	*	++	*
<i>V. alginolyticus</i>	+	*	+++
<i>V. damsela</i>	*	*	+++
<i>V. furnissii</i>	*	+	*
<i>V. hollisae</i>	+	++	*
<i>V. mimicus</i>	*	++	++
<i>V. metschnikovii</i>	+	+	*
<i>V. cincinnatiensis</i>	+	*	*

+++ Association courante; ++ Association possible; + Association rare; * Association non établie avec certitude

2.1.1. *V. cholerae*

Vibrio cholerae est l'agent causatif de la maladie infectieuse souvent épidémique : le choléra. Cette bactérie se transmet à l'hôte humaine à travers l'eau et les aliments contaminés (Depaola, 1981). Une fois dans l'estomac, elle adhère à l'épithélium et produit une entérotoxine appelée « cholera toxin » (CT) qui provoque des diarrhées sévères pouvant engendrer une déshydratation mortelle (Reidl and Klose, 2002).

Jusqu'à 1992, le choléra était causé par le groupe toxigénique *V. cholerae* O1 qui comprend deux biotypes⁵ : classique et El Tor. Ces organismes peuvent être identifiés par l'agglutination de l'antisérum spécifique à l'antigène O1, constituant des lipopolysaccharides de la membrane externe des vibrions (Stroeher et al., 1992). En 1992, une souche appartenant au sérotype O139 a émergé durant les épidémies en Inde et au Bangladesh. Elle est identifiée par l'agglutination dans l'antisérum spécifique au groupe O139 et aussi à la présence de capsule. Cette souche produit la même entérotoxine et a le même potentiel épidémique que les souches O1 (Finkelstein, 1996).

2.1.2. *V. parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus est la principale cause de la gastroentérite engendrée via les fruits de mer crus ou insuffisamment cuits (Barker and Gangarosa, 1974). Son pouvoir pathogène est lié à la production des hémolysines TDH (Thermostable Direct Hemolysin) et TRH (TDH-Related Hemolysin), apparentée à la toxine TDH (Raghunath, 2015; Suthienkul et al., 1995). Ces enzymes ont des activités lytiques, cytotoxiques et entérotoxiques. Elles lysent les érythrocytes et perturbent l'organisation du cytosquelette ainsi que l'homéostasie du calcium (Fabbri et al., 1999; Honda et al., 1992; Raimondi et al., 2000). Dans le milieu naturel, la plupart des souches de *V. parahaemolyticus* ne sont pas pathogènes (Velazquez-Roman et al., 2012). En revanche, les bactéries isolées de patients infectés possèdent les gènes codant pour au moins une des deux hémolysines (Kaufman et al., 2002; Suthienkul et al., 1995).

Les isolats de *V. parahaemolyticus* sont classés par sérotypage en se basant sur les propriétés des antigènes O et K. Toutefois, la corrélation entre le sérotype et le caractère pathogène des bactéries n'a pas été établie jusqu'à l'apparition, en 1996, de souche responsable des maladies appartenant au sérotype O3:K6. Ce clone pandémique a été identifié comme étant

⁵ Le terme « biotype » distingue des caractères biochimiques permettant de définir différents groupes au sein des bactéries d'une même espèce.

le sérotype dominant des cas cliniques décrits dans divers pays incluant l'Inde, l'Asie du sud-est, le Japon, l'Amérique du Nord et l'Europe (Bag et al., 1999; Daniels et al., 2000; Martinez-Urtaza et al., 2005; Matsumoto et al., 2000; Toyofuku, 2014; Vuddhakul et al., 2000).

2.1.3. *V. vulnificus*

Vibrio vulnificus est l'agent étiologique des infections nécrosantes de la peau et de la septicémie chez les humains (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1996; Finkelstein et al., 2002). Cet agent opportuniste engendre une dangereuse septicémie (taux de mortalité excédant 50%) principalement chez les personnes immunodéprimées ou présentant une surcharge en fer dans leur sérum tels que les malades de foie (Hlady and Klontz, 1996). Quant à l'infection cutanée, elle évolue rapidement en cellulite, ecchymoses et potentiellement en fasciite nécrosante. Toutefois elle induit un taux de mortalité plus faible (25%) (Bowdre et al., 1981; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1993; Klontz et al., 1988). Parmi les facteurs de virulence de *V. vulnificus*, la capsule polysaccharidique (CPS) semble jouer un rôle important dans l'inflammation et dans la résistance aux réponses immunitaires (Horseman and Surani, 2011; Yoshida et al., 1985).

Les souches de *V. vulnificus* sont classées suivant des caractéristiques biochimiques en deux biotypes. Le biotype 1 inclue les bactéries responsables de la majorité des infections humaines tandis que les bactéries du biotype 2 sont des pathogènes des anguilles (Amaro and Biosca, 1996; Jones and Oliver, 2009; Tison et al., 1982). Plus récemment, un troisième biotype a été identifié (biotype 3) réunissant des propriétés des deux premiers groupes et causant des infections cutanées (Bisharat et al., 1999; Zaidenstein et al., 2008).

2.2. Les vibrions pathogènes des organismes marins

Les *Vibrio* sont à l'origine de la plupart des pathologies bactériennes en aquaculture marine. Ils touchent tous les types de filières de production incluant poisson, crustacé ou mollusque.

2.2.1. Chez les poissons

La mortalité des poissons par les vibrions est très commune. Elle touche les différents stades de développement, du larvaire à l'adulte, aboutissant dans certains cas à la mort de la population entière (Diggles et al., 2000; Hansen and Olafsen, 1999; Ishimaru et al., 1996; Iwamoto et al., 1995; Olafsen, 2001).

Plusieurs espèces de *Vibrio* ont été décrites pour leur pathogénicité envers les poissons, avec parmi les plus connues *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, et *V. vulnificus* (pour revue, Colwell and Grimes, 1984; Woo et al., 2011).

Vibrio anguillarum a été initialement décrit en 1909 comme l'agent étiologique de la maladie de la peste rouge des anguilles. Actuellement il affecte plus de 50 espèces de poissons d'eau douce et salée comme le saumon atlantique, la truite arc en ciel, le turbot, la daurade ou l'ayu (Frans et al., 2011; Toranzo et al., 2005). Ce pathogène infecte son hôte principalement à travers les blessures dans la peau ou par voie orale. Il adhère, colonise et se prolifère en utilisant le mucus intestinal comme source de nutriments (Olsson et al., 1998; O'Toole et al., 2004). Ensuite, il entre dans la circulation sanguine engendrant une septicémie ou une infection des organes internes comme le foie, la rate et les reins (Grisez et al., 1996).

Vibrio salmonicida est responsable de la maladie d'Hitra appelée également « la vibriose de l'eau froide ». Elle affecte le saumon et la morue cultivés au Canada et dans les pays nordiques (Bruno et al., 1985; Egidius et al., 1986; Sørum et al., 1990). Cette bactérie agit à des températures basses au-dessous de 15°C et provoque une anémie sévère et une importante hémorragie (Toranzo et al., 2005).

2.2.2. Chez les coraux

Le blanchiment est l'une des maladies les plus sévères et les plus répandues chez le corail (Rosenberg and Loya, 2013). Elle se traduit par une décoloration due à l'interruption de la symbiose entre les coraux et les microalgues (les zooxanthelles) (Sutherland et al., 2004). Ce phénomène est généralement corrélé à des conditions environnementales particulières telles que l'élévation de la température ou la réduction de la salinité mais aussi à la présence de bactéries pathogènes du genre *Vibrio* (Rosenberg and Ben-Haim, 2002).

Vibrio shiloi est l'agent étiologique du blanchiment d'*Oculina patagonica*. Sa virulence est strictement reliée à une température élevée, comprise entre 24 et 29°C (Kushmaro et al., 1998, 2001). Dans ces conditions, la bactérie pénètre dans les tissus de son hôte et se transforme en une forme viable et non cultivable (VBNC) lui permettant de se multiplier (Banin et al., 2000). De plus, son internalisation est accompagnée de la production d'une toxine P capable d'inhiber la photosynthèse du zooxanthelle (Banin et al., 2001).

Vibrio coralliilyticus est également un pathogène dépendant de la température, qui affecte *Pocillopora damicornis*. En effet, il est capable d'induire le blanchiment à 25°C et de

lyser les tissus entre 27 et 29°C (Ben-Haim et al., 2003a, 2003b; Ben-Haim and Rosenberg, 2002). Récemment, Rubio-Portillo et al. (2014) ont démontré que *V. coralliilyticus* peut agir en synergie avec *V. shiloi* et induire la maladie à des températures moins importantes (20°C).

2.2.3. Chez les crustacés

La vibriose touche plusieurs espèces de crustacés. Chez les crabes marins, l'infection entraîne une bactériémie ou une maladie de la coquille (voir revue Wang, 2011). De fait, des bactéries du genre *Vibrio* ont été isolées à partir de l'hémolymph du crabe bleu *Callinectes sapidus* (Davis and Sizemore, 1982; Krantz et al., 1969; Welsh and Sizemore, 1985), de *Callinectes bocourti* (Rivera et al., 1999) et du crabe de roche *Cancer irroratus* (Newman and Feng, 1982). De plus, la pathogénicité des isolats a été démontrée en conditions expérimentales (Newman and Feng, 1982). Similairement, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus* ont été décrits comme agents causatifs de la maladie de la coquille chez le homard (Abraham et al., 1996; Porter et al., 2001). La souche luminescente *V. harveyi* a également induit des mortalités importantes dans les cultures des larves de *Sagmariasus verreauxi* en Nouvelle Zélande (Diggles et al., 2000). Ces mêmes espèces (*V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus*) ainsi que *V. anguillarum* et *V. splendidus* ont été associées aux pathologies observées dans les élevages de la crevette *Penaeus monodon* en Inde (Jayasree et al., 2006). Les souches *V. nigripulchritudo* et *V. penaeicida* ont aussi induit d'importantes mortalités chez les crevettes *Litopenaeus stylirostris* cultivées en Nouvelle Calédonie (Goarant et al., 2000, 2006a, 2006b).

2.2.4. Chez les mollusques

Les *Vibrio* affectent les mollusques marins quels que soit leur famille, genre ou espèce. Chez les céphalopodes, *V. alginolyticus* infectent les seiches *Sepia officinalis*, *S. apama* et *S. pharaonis* (Reimschuessel et al., 1990; Sangster and Smolowitz, 2003) tandis que *V. lentus* provoque des lésions de la peau chez la pieuvre sauvage *Octopus vulgaris* (Farto et al., 2003). Chez les gastéropodes, Li et al. (1998) ont reproduit la maladie des pustules blanches de l'ormeau *Haliotis discus* après infection expérimentale par des souches de *V. fluvialis* II. De même, Nicolas et al. (2002) ont prouvé la pathogénicité de *V. carchariae* qui infecte les populations sauvages et d'élevage d'*Haliotis tuberculata*.

Les bivalves constituent la classe la plus touchée par la vibriose. Depuis les épisodes de mortalités observées dans les élevages d'huitres, les études se sont multipliées et différentes souches bactériennes ont été identifiées (voir revues Beaz-Hidalgo et al., 2010; Paillard et al.,

2004; Romalde et al., 2014; Romalde and Barja, 2010; Travers et al., 2015). Le **Tableau 5** récapitule les principales espèces ou groupes décrits.

Tableau 5. Exemples d'espèces de *Vibrio* pathogènes pour les mollusques bivalves (adapté de Travers et al., 2015)

Espèces	Hôte	Références
Groupe <i>V. Splendidus</i>	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Ostrea edulis</i> <i>Perna canaliculus</i> <i>Pecten maximus</i> <i>Venerupis decussatus</i> <i>Venerupis rhomboides</i>	Lacoste et al., 2001; Saulnier et al., 2010 Thompson et al., 2003 Kesarcodi-Watson et al., 2009 Lambert et al., 1999; Nicolas et al., 1996 Gómez-León et al., 2005 Lago et al., 2009
Groupe <i>V. Harveyi</i>	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Venerupis decussatus</i> <i>Pinctada maxima</i>	Saulnier et al., 2010 Gómez-León et al., 2005 Pass et al., 1987
<i>V. tubiashii</i>	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Crassostrea virginica</i> <i>Mercenaria mercenaria</i> <i>Ostrea edulis</i>	Travers et al., 2014 Tubiash et al., 1965 Jeffries, 1982; Lodeiros et al., 1987
<i>V. aestuarianus</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	Garnier et al., 2007; Labreuche et al., 2010
<i>V. coralliilyticus</i>	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Perna canaliculus</i>	Genard et al., 2013 Kesarcodi-Watson et al., 2009
<i>V. tapetis</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Cerastoderma glaucum</i> <i>Pecten glaber</i> <i>Donax trunculus</i> <i>Lithophaga lithophaga</i>	Paillard et al., 2006 El Bour et al., 2008

On distingue particulièrement le groupe *V. Splendidus* qui est souvent relié à plusieurs épisodes de mortalités. Ce clade polyphylétique rassemble jusqu'à aujourd'hui 16 espèces dont certaines sont pathogènes des bivalves (*V. celticus*, *V. crassostreae*, *V. cyclitrophicus*, *V. tasmaniensis* et *V. splendidus*) et d'autres ne le sont pas (Guisande et al., 2004; Prado et al., 2005; Saulnier et al., 2010; Vanhove et al., 2015). Toutefois, ces bactéries à pathotypes⁶

⁶ Le terme « pathotype » est synonyme de « biotype » ou encore de « race physiologique », et désigne une entité génétique d'un agent pathogène définie par son profil de virulence.

contrastés peuvent collaborer dans les infections polymicrobiennes. En effet, les souches virulentes et avirulentes peuvent interagir et faciliter la pathologie induite chez l'huitre par *V. crassostreae* (Lemire et al., 2015) ou *V. tasmaniensis* (Gay et al., 2004). Par exemple, la souche virulente *V. crassostreae* n'a pas d'effet létal à faible dose (4.10^4 UFC/animal) néanmoins en présence de la souche avirulente, elle induit jusqu'à 70% de mortalité (Lemire et al., 2015).

3. Facteurs de virulence

Pour provoquer une maladie, un organisme pathogène doit être capable de coloniser les surfaces de l'hôte, pénétrer dans ses tissus, interférer avec ses mécanismes de défense, pouvoir se multiplier dans l'environnement et enfin causer des dommages à l'hôte (Casadevall and Pirofski, 1999). Pour cela, il utilise des facteurs de virulence qui interviennent au cours de ces différentes phases et qui assurent également sa viabilité. Le **Tableau 6** décrit les principaux facteurs de virulence chez *Vibrio* ainsi que leurs fonctions.

Tableau 6. Les différents facteurs de la virulence décrits chez *Vibrio* adapté de Mersni Achour (2014)

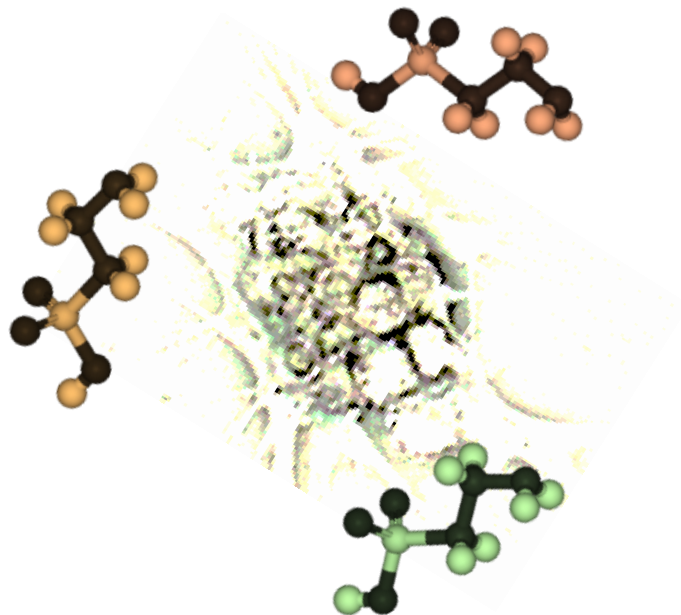
	Facteurs	Fonction(s) principale(s)	Références
Facteurs d'adhésion et de colonisation (Mise en contact hôte-pathogène)	Le flagelle	-Facilite le mouvement chimiotactique dirigé (swarming et swimming) -Attachement -Formation de biofilm -Impliqué dans la virulence (pénétration)	Guentzel and Berry, 1975; Milton et al., 1996; Richardson, 1991; Syed and Klose, 2011
	Les pili (adhésines)	-Mobilité (twitching) -Colonisation -Adhésion -Formation de biofilm	Attridge et al., 1996; Bardy et al., 2003; Li et al., 2008; Shime-Hattori et al., 2006; Thelin and Taylor, 1996; Voss et al., 1996; Voss and Attridge, 1993
	Les protéines de la membrane externe (OMP)	-Adhésion -Invasion -Adaptation du pathogène à divers environnements -Impliquées dans la virulence: adhésion et invasion aux cellules de l'hôte.	Beaubrun et al., 2008; Duperthuy et al., 2011, 2010; Goo et al., 2006; Lin et al., 2002; Nandi et al., 2005
Facteurs d'altération et de multiplication (au niveau membranaire et à l'intérieur de l'hôte)	Enzymes hydrolytiques: Lipases, protéases, nucléases, hyaluronidases, hémolysines (action locale)	-Permettent aux bactéries: d'échapper à la réponse immunitaire humorale et de proliférer dans une niche bien protégée -Réarrangement du cytosquelette d'actine -Augmentent la perméabilité vasculaire et induit la formation d'œdème - Dégradation de substrats comme le collagène et l'élastine	Chuang et al., 1997; Kochut and Dersch, 2013; Miyoshi et al., 1987; Miyoshi and Shinoda, 1992; Niemann et al., 2004; Oliver et al., 1986; Shinoda and Miyoshi, 2011; Teo et al., 2003
	Sidérophores	-Approvisionnement en fer (Fe^{3+}) -Impliqués dans la virulence (multiplication)	Andrus et al., 1983; Guan et al., 2001; Simpson and Oliver, 1983

Tableau 6. (Suite)

	Facteurs	Fonction(s) principale(s)	Références
Facteurs d'altération et de multiplication (au niveau membranaire et à l'intérieur de l'hôte)	Exotoxines : i): Les toxines ciblant la membrane plasmique Les hémolysines	-Lyse cellulaire -Lésion tissulaire -Destruction des cellules du système immunitaire -Induction d'apoptose -Impliquées dans la virulence (formation de pores et désorganisation cellulaire)	Chen et al., 2004; Olivier et al., 2007; Rodkhum et al., 2005; Wong et al., 2012
	RTX (repeats in toxin)	-Lyse cellulaire par formation des pores -Induction d'apoptose -Choc osmotique -Impliqués dans la virulence (formation de pores et désorganisation cellulaire)	Lee et al., 2008; Lin et al., 1999
	ii) les toxines à cible intracellulaire Les toxines du type AB: le plus connu est la toxine cholérique (CT)	-Entérotoxine: provoque l'augmentation d'AMP cyclique qui induit un déséquilibre dans l'absorption des ions Na ⁺ et Cl ⁻ -Modulation de l'immunité de l'hôte -Toxicité	Sanchez and Holmgren, 2011; Satchell, 2003
	iii) Les toxines injectées Le système de sécrétion de type trois ou SSTT)	-Sécrétion et translocation des facteurs de virulence dans la cellule de l'hôte -Impliquées dans la virulence (subvertir le système de signalisation de l'hôte)	Ham and Orth, 2012; Park et al., 2004
	Endotoxines (composés toxiques structuraux de la membrane bactérienne) LPS	-Induction de l'apoptose -Sur-stimulation du système immunitaire -Toxicité	Foster et al., 2000; Jones and Oliver, 2009; Kabir, 1982
Facteurs de résistance au système immunitaire de l'hôte (en contact avec les acteurs du système immunitaires de l'hôte)	Capsule	-Adhésion -Résistance à la phagocytose et aux effets bactéricides du sérum de l'hôte -Impliquée dans la virulence (protection de pathogène)	Casadevall and Pirofski, 2009; Johnson et al., 1992; Trigiani-Fernandez, 2001
	Pompes à efflux	-Résistance multiple aux antibiotiques	Bina et al., 2008
	Superoxyde dismutase (SOD) et catalase	-Inhibition de la production d'espèces oxygénées réactives	Banin et al., 2003; Daily et al., 1978

Chez le groupe *V. Splendidus*, les facteurs de virulence de *V. tasmaniensis* sont les mieux décrits. La porine OmpU a été démontrée pour être un effecteur majeur dans l'interaction entre la souche *V. tasmaniensis* LGP32 et l'huitre creuse. Elle est impliquée dans la virulence de la bactérie et dans la résistance aux peptides antimicrobiens (Duperthuy et al., 2010). De plus, elle favorise l'internalisation du pathogène dans les hémocytes où il peut survivre et éviter son élimination (Duperthuy et al., 2011). *V. tasmaniensis* secrète également des facteurs toxiques dans ses produits extracellulaires comme la métalloprotéase Vsm (Binesse et al., 2008; Le Roux et al., 2007) et les vésicules OMVs (Outer Membrane Vesicles) (Vanhove et al., 2015). Ces dernières sont riches en hydrolases, en particulier la protéase serine vésiculaire qui contribue à la virulence de la bactérie.

Chapitre 2 : Mécanismes de défense contre les contaminants chimiques : le système MXR



I. Contamination chimique des milieux aquatiques

1. Impact des polluants

Durant les dernières décennies, la pollution de l'hydrosphère a augmenté à un taux alarmant principalement à cause du rejet d'un large nombre de polluants de source anthropique. Les effluents agricoles, industriels et domestiques libérés dans l'environnement sont souvent constitués d'un mélange complexe de contaminants toxiques comme les pesticides, les métaux ou encore les substances médicamenteuses (Fisson et al., 2014). Plusieurs centaines de ces composés sont considérés comme particulièrement dangereux, seuls ou en combinaison avec les autres et malgré l'interdiction de leur utilisation ils continuent à être présents dans l'environnement ce qui constitue une menace pour les prochaines décennies (Richardson, 2002; Smith et al., 2013).

Le devenir des contaminants dépend de leurs propriétés physicochimiques, en particulier de leur caractère lipophile, de leur pression de vapeur et de leur stabilité chimique (Walker et al., 2016). Parmi ces contaminants, sous l'influence de l'environnement, certains sont transformés par chélation, hydrolyse, photodégradation, biodégradation etc. Toutefois, dans la plupart des cas, les produits de métabolisation sont aussi toxiques que la molécule initiale voire plus (Amiard-Triquet et al., 2016). Outre la dégradation de la qualité des eaux, la présence des xénobiotiques (dans leur état initial ou sous forme de métabolites) entraîne des répercussions sur les organismes aquatiques touchant différents niveaux d'intégration à l'échelle des individus, des populations, des communautés et enfin des habitats (Figure 15). En effet, l'impact sur les organismes aquatiques des métaux et des polluants organiques persistants tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les polychlorobiphényles (PCBs), les polybromodiphényléséthers (PBDE) et les pesticides, est reconnu depuis longtemps (voir Mearns et al., 2015 pour revue). En plus de ces contaminants dits classiques, de nouveaux polluants émergents apparaissent dans le milieu et semblent avoir des effets néfastes sur les organismes aquatiques (Mottaleb et al., 2015). Ils regroupent les substances pharmaceutiques, domestiques, industrielles et de soins corporels (Geissen et al., 2015). Entrant par voie respiratoire (branchies), dermique ou orale, ces différentes classes de polluants peuvent altérer la croissance, la reproduction ou encore le système immunitaire de plusieurs espèces de vertébrés et d'invertébrés marins (Akaishi et al., 2007; Allen et al., 1999; Chagot et al., 1990).

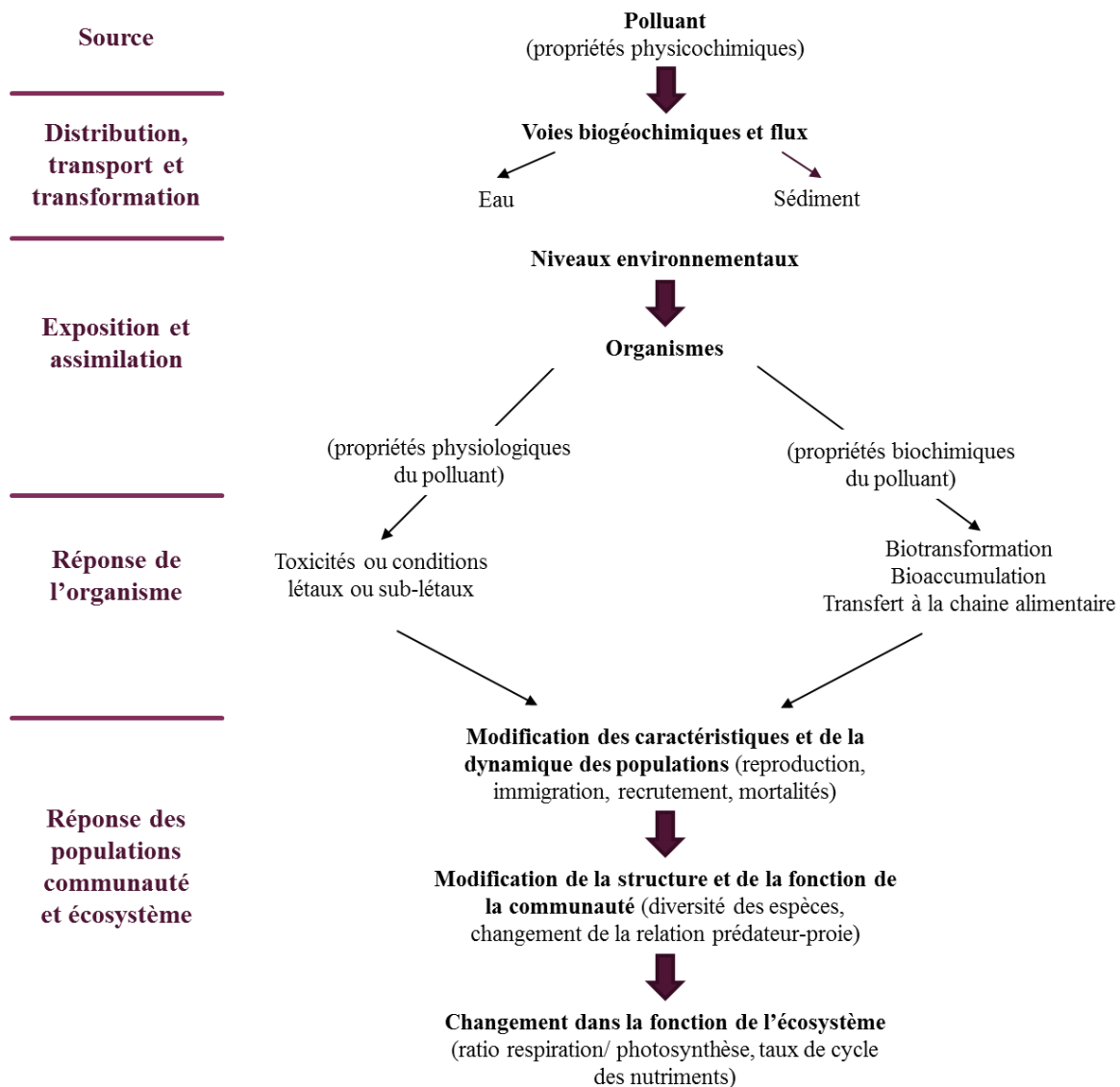


Figure 15. Impact des polluants sur les organismes et l'écosystème (adapté de [Mason, 2002](#))

2. Biosurveillance

Pendant longtemps, l'étude de la pollution des écosystèmes s'est fondée sur des procédés de chimie analytique permettant de détecter ou doser les contaminants. Toutefois, cette approche n'est pas utilisable dans la réalité environnementale caractérisée par une contamination multiple associée à des stress variés induisant des effets cocktails. De plus, la présence d'un xénobiotique dans un milieu n'indique pas son pouvoir d'endommagement. De ce fait, il est indispensable non seulement de connaître la distribution des polluants et leur concentration dans les biotopes mais aussi leur niveau d'accumulation dans les organismes ainsi que leurs effets sur l'état de santé ([Ramade, 2007](#)).

Ces informations permettent d'établir des connections entre les niveaux d'exposition, les niveaux de contamination des tissus et les impacts précoces. C'est dans cette optique que la biosurveillance a pris place et a complété la surveillance chimique. La démarche s'appuie sur des espèces bioindicatrices pour 1) détecter l'effet des contaminants sur l'abondance relative, la présence ou absence de ces espèces et le changement dans la structure de peuplement ; 2) évaluer les effets des contaminants sur les organismes à des doses sublétales et les corrélérer avec les concentrations observées et d'autres indicateurs abiotiques et biotiques et 3) repérer l'éventuelle existence de souches naturelles résistantes parmi les espèces tolérantes à la pollution ([Ramade, 2007](#)).

Les invertébrés aquatiques sont souvent utilisés dans la biosurveillance grâce aux avantages qu'ils présentent. Ils sont relativement faciles à échantillonner, à transporter, couvrent une grande diversité phylogénétique, sont omniprésents et abondants. Toutefois, ils présentent aussi des inconvénients tels que la différence entre leur physiologie et celle des vertébrés ce qui empêche la transposition simple des observations. Parmi les espèces les plus utilisées dans la biosurveillance, on retrouve les moules. Ces dernières ont été utilisées dans les programmes de monitoring de la qualité des milieux côtiers, tels que le Réseau national d'Observation de la Contamination CHimique du milieu marin (ROCCH, ancien RNO) en France ou encore le « Mussel Watch Program » aux Etats-Unis depuis 1986 ([Beliaeff et al., 2002](#)). Lors de ces programmes, des indicateurs biologiques ou biomarqueurs ont été mesurés. Les biomarqueurs s'appuient sur une série de changements physiologiques, biochimiques et histologiques dans les échantillons biologiques pouvant indiquer un impact direct ou indirect de polluants ([Huggett, 1992](#)).

II. Mécanismes de défense contre les xénobiotiques

Des mécanismes de défense permettent aux organismes aquatiques de faire face à la présence des polluants dans leur environnement en prévenant leur toxicité. Ils limitent leur bioaccumulation, par le contrôle de la distribution et l'augmentation de l'excrétion, mais aussi transforment le composé chimique sous une forme physicochimique non toxique lorsqu'il est internalisé ([Amiard et al., 2006](#); [Marigómez et al., 2002](#); [Perales-Vela et al., 2006](#)). Dans la section qui suit, les processus de détoxification seront principalement développés.

1. Les métallothionéines

Les métallothionéines (MTs) sont des protéines soufrées de faible masse moléculaire. Elles jouent un rôle important dans les processus de protection cellulaire contre les actions des agents dangereux et dans les mécanismes contrôlant la croissance, la différenciation et la prolifération des cellules (voir revue [Mao et al., 2012](#)).

Elles sont connues pour leur fonction de régulation des teneurs internes en métaux essentiels (Cu, Zn) et la détoxification des métaux non-essentiels (Ag, Cd, Hg) ([Roesijadi, 1992](#); [Viarengo and Nott, 1993](#)). L'induction de la synthèse des MTs par les métaux a été démontrée chez plusieurs espèces aquatiques notamment les invertébrés, suggérant le potentiel de leur utilisation en tant que biomarqueurs (voir revue [Amiard et al., 2006](#)). Par exemple, [Couillard et al. \(1995\)](#) ont montré l'augmentation lente des MTs chez des populations de moule d'eau douce, *Pyganodon grandis*, transférées dans un lac très contaminé. De plus, cet accroissement était corrélé avec une augmentation tout aussi lente des concentrations tissulaires de cadmium. Des résultats similaires ont été observés chez la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* ([Mourgaud et al., 2002](#)).

2. Les enzymes de phase 0, I, II et III

La bioaccumulation des composés organiques s'effectue principalement d'une manière passive à cause de leur hydrophobicité. Une fois absorbé, le xénobiotique peut suivre une voie de détoxification permettant son excrétion de l'organisme avant d'exercer son effet toxique ([van der Oost et al., 2003](#)). Parmi les voies de détoxification cellulaire, la biotransformation des xénobiotiques par les enzymes de phase I et II est la plus étudiée. Elle consiste en un processus en deux phases de réactions enzymatiques qui convertissent les produits lipophiles en métabolites plus hydrophiles permettant ainsi leur élimination ([Black and Coon, 1987](#); [Vrolijk et al., 1994](#)). Les enzymes de la phase I à cytochromes P450 (CYP), catalysent essentiellement les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse permettant l'introduction d'un groupe fonctionnel au xénobiotique ([Commandeur et al., 1995](#); [Sheweita, 2000](#)). Par exemple, le cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) est induit par l'activation du récepteur de l'aryl hydrocarbène (AHR) suite à la liaison du benzo[a]pyrène ([Nebert et al., 2000](#)). Quant aux enzymes de la phase II (comme la glutathione-S-transférase ou GST), elles permettent la conjugaison des métabolites issus de la phase I avec un ligand endogène ([Jancova et al., 2010](#)).

Deux étapes de transport sont ajoutées aux activités de biotransformation et nommées respectivement phase 0 et phase III de la détoxification (**Figure 16**). Elles impliquent l'efflux des

composés chimiques parents et de leurs dérivés par les transporteurs ABC (ATP binding cassette) comme la Pgp (P-glycoprotéine) et la MRP (multidrug resistance protein) (Szakács et al., 2008; Xu et al., 2005). La Pgp et l'ABCG2 exportent des produits chimiques dans leur forme d'origine ou métabolisée contrairement à MRP1 qui efflue principalement des métabolites et le glutathion (Sharom, 2008).

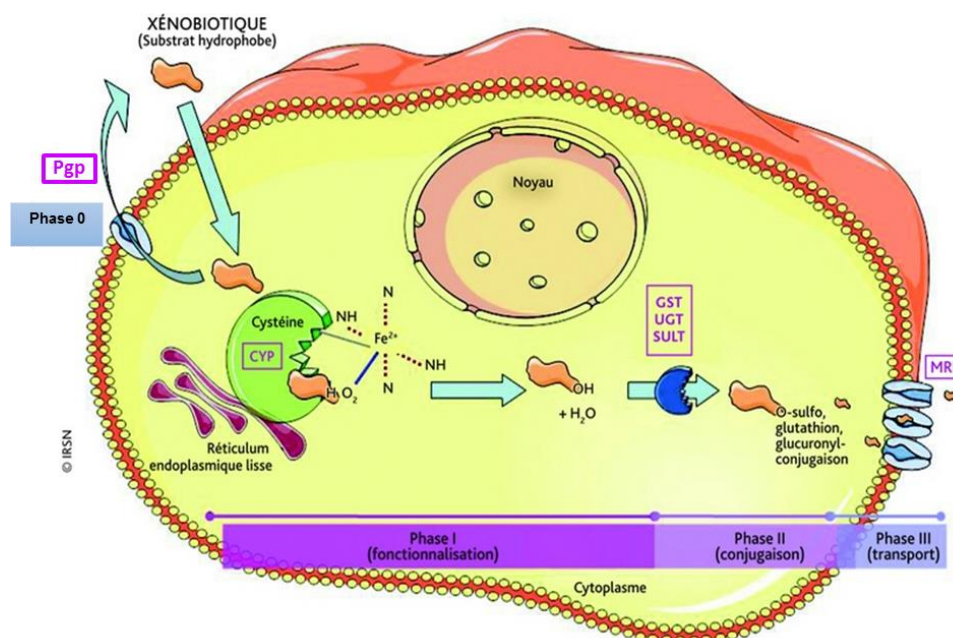


Figure 16. Métabolisme des xénobiotiques au niveau cellulaire (source IRSN <http://www.irsn.fr/>)
CYP (les cytochromes P450), SULT (sulfotransférase), GST (glutathion-S-transférase), UGT (UDP glucuronosyltransférase), MRP (multidrug resistance proteins)

De nombreuses études ont décrit l'induction des cytochromes P450 chez les bivalves par les contaminants organiques, particulièrement les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (Livingstone et al., 1997; Petushok et al., 2002; Porte et al., 2001; Serafim et al., 2008). Par exemple, l'activité de la NAD(P)H cytochrome c reductase augmente dans les tissus de moules exposées au benzo[a]pyrène au laboratoire (Michel et al., 1993) ou transplantées dans des milieux à forte contamination organique (Michel et al., 1994; Nasci et al., 2002).

3. Le système MXR

Le système MXR ou « Multixenobiotic Resistance » est un mécanisme d'efflux des xénobiotiques connu chez les organismes aquatiques (voir revue Bard, 2000). Il a été nommé ainsi par analogie au phénomène de résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie appelé « Multidrug Resistance » ou MDR (Kurelec, 1992). Comme son analogue, il utilise des protéines transmembranaires appelées transporteurs ABC qui effluent activement les composés

toxiques à travers la membrane cellulaire. Cette résistance a été décrite pour la première fois chez la moule d'eau douce *Anodonta cygnea* (Kurelec and Pivcević, 1989). Par la suite plusieurs études ont identifié et caractérisé le phénotype MXR chez de nombreuses espèces aquatiques comme les éponges (Kurelec et al., 1992), les mollusques (Faria et al., 2011; McFadzen et al., 2000; Rioult et al., 2014), les crabes (Köhler et al., 1998; Minier et al., 2008), les oursins (Hamdoun et al., 2002; Toomey and Epel, 1993), les daphnies (Campos et al., 2014) et surtout les poissons (Chan et al., 1992; Ferreira et al., 2014; Fischer et al., 2013; Luckenbach et al., 2014).

III. Les Transporteurs ABC effecteurs du phénotype MXR

1. La famille ABC

Les transporteurs ABC représentent une des plus larges familles de protéines en biologie (Dassa and Bouige, 2001). Chez les eucaryotes, ils jouent un rôle exclusivement exportateur et sont situés au niveau de la membrane plasmique et de celle des organites subcellulaires (Sharom, 2008). Dépendants de l'ATP, ils interviennent dans le transport des différents substrats (sucres, acides aminés, lipides...) à travers les membranes ou dans l'efflux des xénobiotiques (Dean et al., 2001; Leslie et al., 2005). D'autres membres de la famille ABC peuvent avoir la fonction de canaux ioniques, récepteurs ou facteurs intervenant dans la transcription et la traduction (Dean et al., 2001). 48 gènes ABC ont été identifiés chez l'humain. Ils sont divisés en 7 sous-familles nommées de ABCA à ABCG (Dean et al., 2001). Récemment, une 8ème sous-famille appelée ABCH a été découverte chez le poisson zèbre mais sa fonction est encore inconnue (Popovic et al., 2010).

1.1. Structure

Sur le plan structural, les sous-familles présentent un haut degré d'homologie avec toutefois certaines variations (Linton and Higgins, 2007). Typiquement, une protéine fonctionnelle complète contient deux domaines cytoplasmiques NBDs (Nucleotide Binding Domains) qui hydrolysent l'ATP et deux domaines transmembranaires MSDs (Membrane Spanning Domains) qui participent à la reconnaissance et le transport des substrats (Leslie et al., 2005). Il existe également des demi-transporteurs constitués d'un seul domaine NBD et un MSD qui doivent former des homo- ou hétérodimères pour être une pompe fonctionnelle (Schinkel and Jonker, 2003). Les groupes ABCA et ABCC sont entièrement composés de transporteurs complets contrairement aux sous-familles ABCD, ABCG, et ABCH qui ne comptent que des demi-transporteurs. Dans le cas des protéines d'ABCB, on trouve les deux

configurations. Enfin, les sous-familles ABCE et ABCF regroupent des protéines agencées uniquement en deux NBDs sans MSDs. Les membres de ces sous-familles n'interviennent pas dans les transports membranaires (voir revue [Dean et al., 2001](#)).

Les NBDs partagent trois motifs caractérisant la cassette de fixation de l'ATP (**Figure 17**) : les motifs Walker A appelé aussi P-loop (GXXGXGK(S/T), X représentent un acide aminé variable) et Walker B ($\phi\phi\phi\phi$ D avec ϕ résidu hydrophobe) communs à toutes les protéines fixant des nucléosides triphosphates, et un motif C qui constitue la signature spécifique des transporteurs ABC ([Mourez et al., 2000](#); [Walker et al., 1982](#)). Le motif C contient une séquence consensus LSGGQ qui a pour fonction de transmettre les signaux des régions NBDs aux TMDs ([Borges-Walmsley et al., 2003](#)). Toutefois, il peut exister des variations de motif par exemple, chez les champignons, on retrouve plus fréquemment une signature VSGGE ([Kumar et al., 2010](#)). D'autres motifs conservés dans la région NBD semblent jouer un rôle important dans le mécanisme catalytique. La boucle « A-loop » contient un résidu aromatique essentiel pour l'union et l'hydrolyse de l'ATP ([Ambudkar et al., 2006](#)). La « Q-loop » est caractérisée par la présence d'un résidu invariant de glutamine qui s'engage dans de nombreuses interactions avec les domaines transmembranaires ([Dalmas et al., 2005](#); [Takahashi et al., 2005](#)). La « D-loop » formée d'un résidu d'acide aspartique est impliquée dans l'activité catalytique des sites actifs ([Schmitt and Tampé, 2002](#)). Enfin, la « H-loop » dotée d'un résidu histidine est nécessaire pour l'hydrolyse de l'ATP et l'activité du transport ([Nikaido and Ames, 1999](#); [Shyamala et al., 1991](#)).

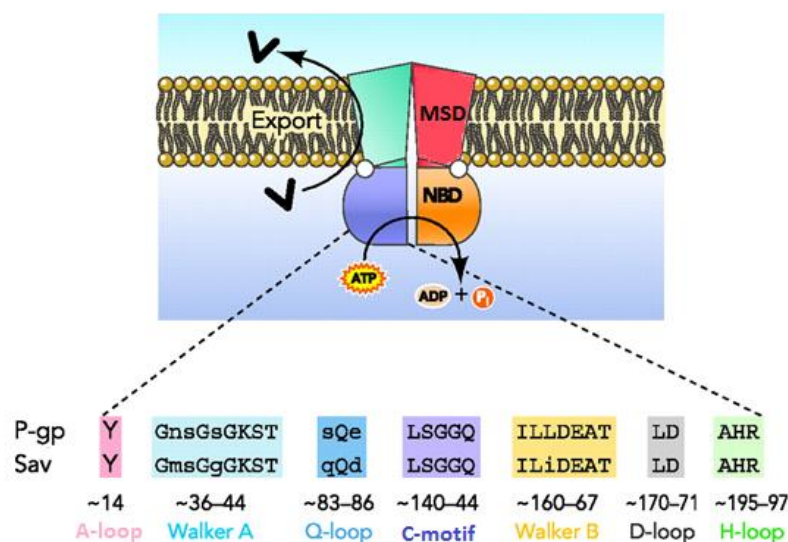


Figure 17. Structure des transporteurs ABC et séquences d'acides aminés caractéristiques des domaines NBDs ([Linton, 2007](#) modifié). Une pompe ABC contient typiquement 2 domaines transmembranaires MSDs (membrane spanning domains) et deux domaines cytoplasmiques NBDs (nucleotide binding domains). Les NBDs contiennent des motifs fortement conservés: Walker A/P-loop, Motif C, Walker B, A-loop, Q-loop, D-loop, H-loop. P-gp: P-glycoprotéine, Sav: transporteur ABC de *Staphylococcus aureus*.

1.2. Mécanismes de transport

A l'heure actuelle, les mécanismes d'action détaillés des transporteurs ABC restent controversés. Plusieurs modèles ont été proposés en se basant sur les données biochimiques et structurales. Les plus connus pour la Pgp sont les configurations « alternance de site » et « ATP-switch » (Higgins and Linton, 2004; Senior et al., 1995). Le premier modèle (alternance de site) suppose l'existence d'un cycle catalytique alternant entre les 2 NBDs durant l'hydrolyse de l'ATP. Dans ce cas, les deux sites nucléotidiques ne fonctionnent pas en même temps mais ils se relaient. De plus, cette configuration considère l'hydrolyse de l'ATP comme l'étape énergétiquement la plus importante (Senior et al., 1995). Quant au modèle « ATP-switch », il suggère un fonctionnement combiné des deux sites nucléotidiques. Contrairement à la configuration d'alternance de site, la liaison de l'ATP constitue la principale source d'énergie pour le transport (Higgins and Linton, 2004). La **Figure 18** décrit les principales étapes du mécanisme.

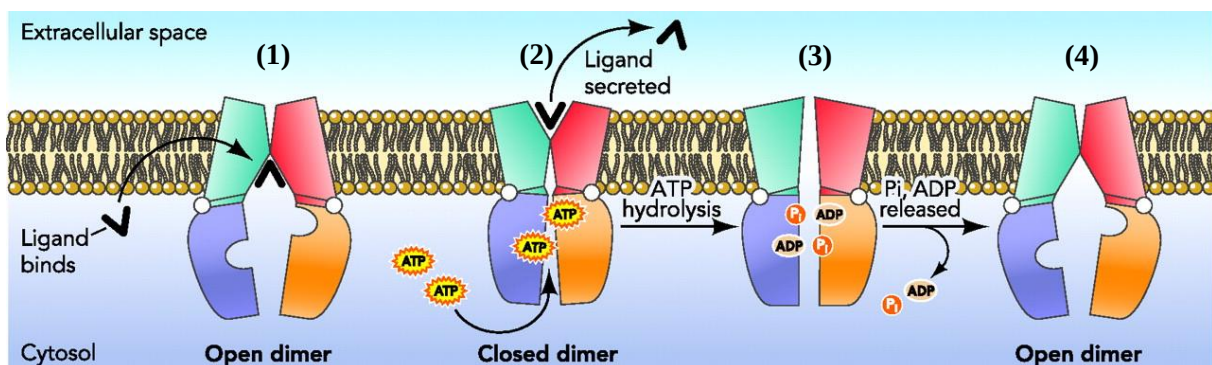


Figure 18. Mécanisme de transport des pompes ABC selon le modèle « ATP-switch » (Linton, 2007)

Quatre étapes sont décrites : (1) La liaison du ligand au MSD induit un changement conformationnel du NBD et une augmentation de son affinité pour l'ATP, (2) la liaison de l'ATP provoque la fermeture des domaines nucléotidiques et par conséquent un réarrangement des domaines transmembranaires suffisant pour déplacer le ligand vers l'extérieur (3) l'hydrolyse de l'ATP permet la dissolution du dimère NBD fermé (4) le relargage de l'ADP et le Phosphate inorganique Pi complète le cycle de transport et rétablit la haute affinité de la protéine pour le ligand

2. Les principaux transporteurs impliqués dans la résistance MDR/MXR

Parmi les pompes associées à l'efflux des composés chimiques, on distingue les sous-familles les plus étudiées B, C et G.

2.1. La P-glycoprotéine (Pgp)

La Pgp est la pompe ABC la mieux caractérisée, elle appartient à la famille ABCB. Chez les humains, elle est codée par deux gènes MDR1 et MDR3 toutefois le terme Pgp se réfère souvent à l'isoforme MDRI de la classe 1 (Ferreira et al., 2014). C'est une protéine de 170 kDa contenant 1280 acides aminés. Elle a une structure complète de 4 domaines (2 NBDs et 2 MSDs) avec 6 hélices transmembranaires dans chaque région MSD (Loo and Clarke, 1999) (Figure 19). ABCB1 est le premier membre identifié chez les eucaryotes, à cause de son implication dans la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie (Gottesman and Ling, 2006). Cette pompe est caractérisée par sa « non spécificité » remarquable vis-à-vis des allocrites⁷. En effet, son large spectre de transport inclut les produits naturels, les médicaments antinéoplasiques ou encore les stéroïdes (Sharom, 2008). Toutefois, certaines études ont indiqué des caractéristiques communes à ces substrats telles que l'hydrophobicité modérée, la petite taille, la charge positive ou la présence de domaines neutres (Ferreira et al., 2014; Ueda et al., 1997).

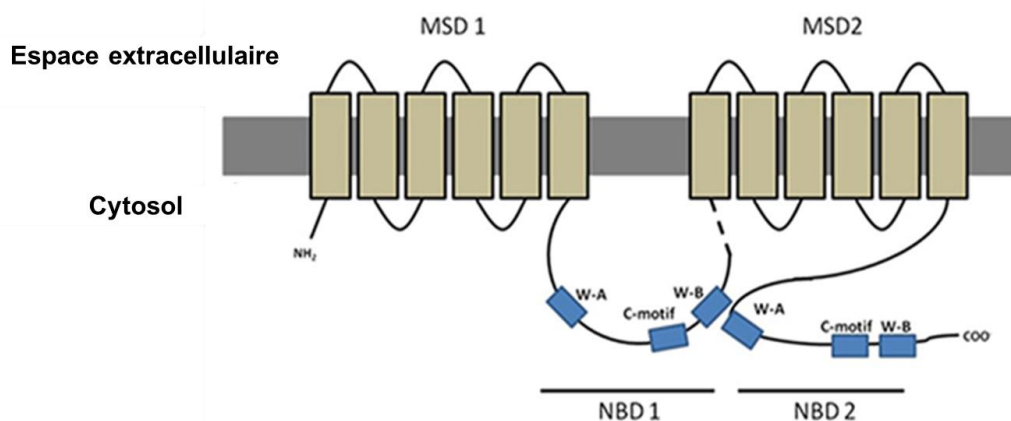


Figure 19. Structure de la Pgp (Ferreira et al., 2014)

MSD (membrane spanning domains), NBD (nucleotide binding domains), W-A (walker A) et W-B (walker B)

⁷ Un allocrite est défini comme un composé transporté par une pompe ABC.

2.2. Les Multidrug related proteins (MRPs)

Après la découverte de l'ABCB1, l'étude du phénotype MDR dans les cellules cancéreuses a permis l'identification de l'ABCC1, premier membre de la sous-famille ABCC (Cole et al., 1992). Cette dernière comprend 13 membres dont les transporteurs ABCC1-5 potentiellement impliqués dans la résistance aux médicaments, particulièrement les composés anioniques (Cole et al., 1992; Evers et al., 1998; Kool et al., 1997).

Les protéines MRP1 et MRP2 sont les transporteurs les plus connus de ce groupe. Elles font une taille de 190 kDa et ont une structure atypique. En effet, en plus des quatre domaines typiques du transporteur complet, ces pompes comprennent une région MSD (MSD0) supplémentaire située au terminal N (Figure 20). Toutefois, le domaine MSD0 ne semble pas être essentiel pour l'activité de transport de MRP1 (Bakos et al., 1998). De plus, malgré la différence structurale et le faible degré d'homologie avec ABCB1 (15%), la résistance aux agents anticancéreux conférée par la surexpression de l'un ou l'autre de ces deux transporteurs a un profil similaire à celle associée à la Pgp (Cole et al., 1994; Leschziner et al., 2006). MRP1 transporte aussi une variété de molécules endogènes comme le glutathione, les composés conjugués au glucuronide ou au sulfate (Sharom, 2008).

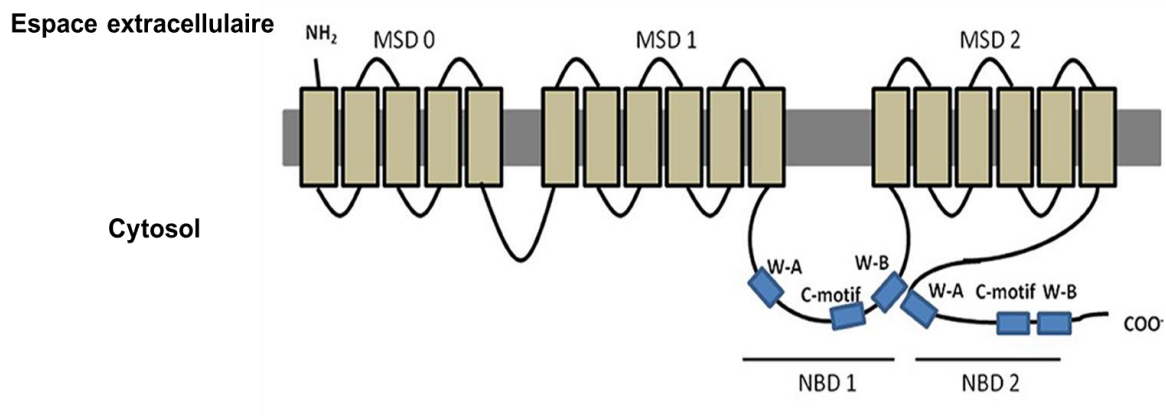


Figure 20. Structure des transporteurs MRP1 et MRP2 (Ferreira et al., 2014)

MSD (membrane spanning domains), NBD (nucleotide binding domains), W-A (walker A) et W-B (walker B)

2.3. La Breast cancer resistance protein (BCRP)

La BCRP est également connue sous le nom ABCG2, MitoXantrone-resistance protein (MXR), ou encore Placenta specific ABC protein (ABCP). Cette protéine est le deuxième membre de la famille ABCG. Elle a été initialement découverte dans les cellules MCF-7 d'adénocarcinome mammaire humain (Doyle et al., 1998). Peu de temps après, deux protéines quasi identiques ont été identifiées à partir d'une lignée humaine de carcinome du colon hautement résistante à la mitoxantrone (appelée MXR) et à partir du placenta humain (appelée ABCP) (Allikmets et al., 1998; Miyake et al., 1999). Dans ce manuscrit, on utilisera que les dénominations BCRP/ABCG2 afin d'éviter la confusion avec le système MXR (Multixenobiotic resistance). La BCRP est un demi-transporteur de 72 kDa, composé d'un domaine NBD et d'un MSD (Figure 21). Elle a une configuration atypique dans laquelle la région NBD précède la MSD contrairement aux groupes ABCB et ABCC. Elle peut transporter plusieurs substrats allant des agents chimiothérapeutiques aux composés organiques anioniques (Mao and Unadkat, 2005).

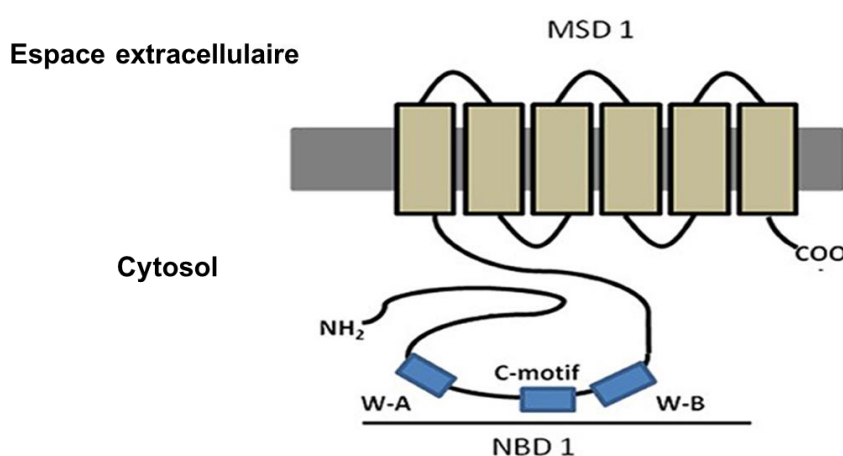


Figure 21. Structure de la BCRP (Ferreira et al., 2014).

MSD (membrane spanning domains), NBD (nucleotide binding domains), W-A (walker A) et W-B (walker B)

3. Les outils d'étude du système MXR chez les bivalves

La présence des transporteurs ABC a été explorée chez les bivalves en utilisant des outils de détection moléculaire ou protéique ou encore par des approches fonctionnelles via des tests biochimiques.

3.1. Détection moléculaire et protéique

Parmi les transporteurs ABC, la Pgp est la pompe la plus étudiée. Minier et al. (1993) ont été les premiers à avoir décrit des régions conservées du gène *mdr* ainsi que des protéines homologues à la Pgp dans des extraits d'ADN et de protéines de *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas*. Par la suite, plusieurs études ont identifié partiellement les transcrits de *abcb1-like* dans différents organes de ces espèces (Luedeking and Koehler, 2002; Minier et al., 2002; Minier and Galgani, 1995) ainsi que chez *Mytilus galloprovincialis* (Della Torre et al., 2014), *Dreissena polymorpha* (Faria et al., 2011) et *Corbicula fluminea* (Chen et al., 2015). D'autres travaux ont utilisé l'anticorps monoclonal de la Pgp humaine C219 pour détecter la protéine principalement dans les branchies des moules *M. californianus* (Eufemia and Epel, 2000), *M. galloprovincialis* (Kurelec et al., 1996) *M. edulis* (Minier and Galgani, 1995; Minier and Moore, 1996) et *D. polymorpha* (Minier et al., 2006), les huîtres *C. gigas* (Keppler and Ringwood, 2001) et *S. forskali* (Kingtong et al., 2007) et la palourde *C. fluminea* (Achard et al., 2004). Depuis 2008, des études plus abouties sont apparues en combinant les outils moléculaires, protéiques et dans certains cas fonctionnels. Par exemple, Luckenbach and Epel, 2008 ont caractérisé la Pgp dans les branchies de *M. californianus* en décrivant la séquence complète d'acides aminés et en localisant la protéine dans les tissus ainsi que son activité d'efflux. Plus récemment, la Pgp a été similairement caractérisée chez *P. viridis*, *R. philippinarum*, *S. subcrenata* et *T. granosa* (Huang et al., 2014, 2015).

Quelques auteurs se sont intéressés à l'étude de la MRP chez les bivalves. Luedeking et al. (2005) ont isolé et caractérisé à partir des tissus de la moule bleue deux séquences apparentées à MRP1 et MRP2 (respectivement 50 et 70% d'homologie). Par la suite, d'autres transcrits *mrp-like* (partiels ou complets) ont été identifiés chez les moules *M. californianus* (Luckenbach and Epel, 2008), *M. galloprovincialis* (Della Torre et al., 2014) et *D. polymorpha* (Faria et al., 2016) ainsi que chez la palourde *C. fluminea* (Chen et al., 2015). La détection de la protéine est peu fréquente voire absente pour cette classe de transporteur. Une seule étude a décrit l'immunodétection de la MRP1 dans les branchies, manteau et la glande digestive de l'huître *S. forskali* (Kingtong et al., 2007).

La sous famille G2 est moins étudiée chez les bivalves. A notre connaissance, la présence de transcrits homologues à l'ABCG2 a été démontrée uniquement dans la glande digestive de la palourde asiatique *C. fluminea* (Chen et al., 2015) et de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* (d'après la base de données NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HE599220.1>). Un gène codant pour l'ABCG2 a été

également identifié chez l'huitre creuse *C. gigas* (Zhang et al., 2012). Similairement à la Mrp, la protéine ABCG2 a été seulement détectée dans les tissus de *S. forskali* (Kington et al., 2007).

3.2. Approche fonctionnelle biochimique

En plus des substrats cités auparavant (cf. paragraphe 2), les pompes ABC sont capables de transporter des composés fluorescents. Cette propriété constitue un outil utile pour explorer leur activité à travers des essais d'accumulation de fluorescence dans la cellule ou de son efflux dans le milieu extracellulaire. Toutefois, certaines sondes sont allocrites de plusieurs transporteurs ce qui empêche la différenciation des activités dans un système muni de plusieurs pompes (Figure 22 A).

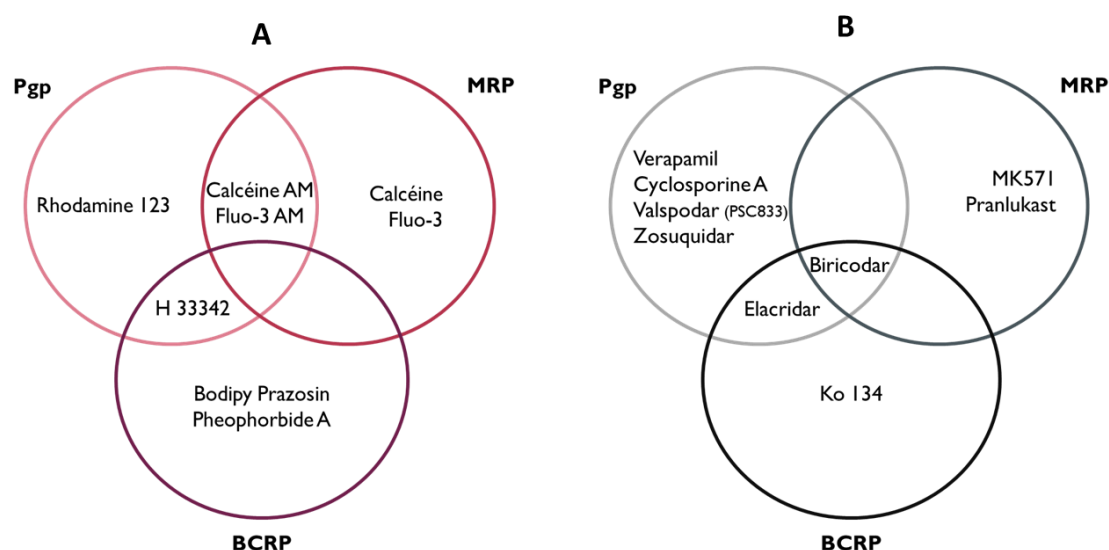


Figure 22. Diagrammes de Venn représentant des exemples de sondes fluorescentes allocrites et de modulateurs des transporteurs ABC humains. (A) sondes fluorescentes allocrites des transporteurs ABC humains d'après Sarkadi et al., 2006. H 33342 : Hoechst 33342 (adapté des données de Sharom, 2008 avec modification). Le Pheophorbide A a été rajouté en tant qu'allocrite de la BCRP. **(B)** Les modulateurs cliniques de l'activité des Pgp, MRP1 et BCRP humains (Sharom, 2008 modifié)

Pour remédier à cette difficulté, des modulateurs sont utilisés. Ces substances ont été développées dans le but d'inhiber ou inactiver les transporteurs et par conséquent augmenter la concentration des médicaments anti cancer dans la cellule (Kathawala et al., 2015). Combinés avec les sondes fluorescentes, ils permettent de distinguer l'activité des différents transporteurs. Un large nombre de modulateurs a été identifié pour la Pgp contrairement à la MRP et l'ABCG2 (Figure 22B). Certains sont spécifiques à un seul transporteur tandis que d'autres ne le sont pas (comme le biricodar ou l'elacridar).

Plus récemment, d'autres classes de modulateurs d'origine naturelle ont été décrites. On cite le triterpène sipholane isolé de l'éponge marine *Callyspongia siphonella* capable d'inhiber l'activité de la Pgp (Shi et al., 2007) ou encore le curcumin bloqueur de l'efflux des pompes ABCB1, ABCC1 et ABCG2 (Limtrakul, 2007).

Plusieurs travaux ont mesuré l'activité d'efflux des pompes ABC chez des espèces de bivalves en se fondant sur la pharmacologie connue chez l'humain. Initialement, les essais étaient focalisés sur l'étude de la Pgp. Grâce à la sonde fluorescente rhodamine B et les inhibiteurs verapamil et cyclosporine A, les auteurs ont mis en évidence une activité d'efflux dans les hémocytes des moules *M. edulis* et *U. pictorum* ainsi que dans les branchies de *U. pictorum*, *D. polymorpha* et *M. californianus* (Eufemia and Epel, 2000; Minier and Moore, 1996; Smital and Kurelec, 1998; Zaja et al., 2006) ou encore dans les larves et les embryons de *M. edulis* (McFadzen et al., 2000). Par la suite, la présence d'un autre transporteur (MRP1) a été révélée dans les branchies de *M. californianus*, *M. galloprovincialis* et *D. polymorpha* en utilisant la sonde calcéïne AM, commune aux pompes Pgp et MRP1, combinée avec d'autres inhibiteurs spécifiques (Della Torre et al., 2014; Faria et al., 2016; Luckenbach et al., 2008). Quant aux hémocytes, l'efflux de la pompe ABCC1 a été mesuré chez la moule méditerranéenne et la moule bleue (Della Torre et al., 2014; Rioult et al., 2014). Jusqu'à maintenant, il n'existe aucune donnée sur la présence d'une activité ABCG2 chez ces organismes.

4. Régulation du système MXR chez les bivalves

La modulation du système MXR a été fréquemment décrite chez les bivalves. Des réponses d'induction ou d'inhibition par des facteurs biotiques et abiotiques ont été observées au niveau génique et/ou protéique. Les effets diffèrent en fonction des organismes mais aussi des tissus étudiés. Toutefois, les mécanismes de régulation restent méconnus. Une étude récente a suggéré l'implication de la voie cAMP/PKA dans la régulation transcriptionnelle de l'ABCB et l'ABCC dans les hémocytes de la moule méditerranéenne (Franzellitti et al., 2016; Franzellitti and Fabbri, 2013).

4.1. Par les contaminants

Le système MXR peut être induit en réponse à l'exposition à des contaminants chimiques. Cette propriété a fait de lui l'objet de plusieurs études en vue de son utilisation en tant qu'un potentiel biomarqueur de l'état de santé des organismes mais aussi de la présence de polluants dans l'environnement (Bard, 2000; Minier et al., 1999). Chez les bivalves, des

mesures d'activité ou d'expression des protéines et des gènes des transporteurs ABC ont été effectuées sur des animaux prélevés ou transplantés dans des sites contaminés ou encore exposés au laboratoire. En conséquence, les auteurs ont corrélé l'induction observée avec la présence de contaminants de nature organique (HAP, PCB), métallique (cadmium) ou biologique (dinoflagellés). Le **Tableau 7** recense les différents travaux et les principaux résultats.

D'autres types de contaminants peuvent avoir l'effet inverse sur le phénotype MXR. Ces substances appelées chimio-sensibilisateurs inhibent le fonctionnement des pompes ou leur expression ce qui constitue une menace pour leur rôle protecteur. Parmi ce groupe, on trouve des médicaments comme la fluoxétine et des toxines algales (**Tableau 8**).

4.2. Effet saison

Outre la régulation par les contaminants, le système MXR peut être influé par le changement saisonnier. A cet égard, de nombreux travaux ont associé l'élévation de la température avec l'augmentation de l'expression de la Pgp ou de son activité chez *M. galloprovincialis* (Kamel et al., 2014; Minier et al., 2000), *D. polymorpha* (Minier et al., 2006; Pain et al., 2007) et *C. virginica* (Keppler and Ringwood, 2001). Toutefois, ces résultats sont issus d'étude sur le terrain où différents facteurs peuvent intervenir en plus de la température (salinité, disponibilité en nourriture, turbidité, pH, état physiologique, reproduction...). Ceci rend l'interprétation des données plus délicate d'autant plus que certains auteurs ont rapporté l'absence d'effet de la température sur l'expression de la Pgp au niveau protéique chez *D. polymorpha* (Tutundjian and Minier, 2007) ou génique chez *M. edulis* (Luedeking and Koehler, 2004). De plus, selon Luedeking and Koehler (2004) il semble que l'anaérobiose et la haute osmolarité induisent une surexpression des transcrits de la Pgp et pas de la mrp2 dans les branchies de la moule bleue.

Tableau 7. Récapitulatif des études décrivant l'induction du phénotype MXR chez les bivalves par des contaminants chimiques ou biologiques

Organisme	Tissu	Nature de la contamination	Paramètres étudiés	Résultats	Références
<i>M. galloprovincialis</i>	Branchies	Etude terrain : milieux contaminés au benzo[a]pyrène	Efflux de la G ³ -H vincristine	Plus d'activité d'efflux dans le site contaminé	Kurelec et al., 1996
<i>M. californianus</i>	Branchies	Exposition au laboratoire : pentachlorophenol et chlorthal DDE, cadmium, arsénite	Protéine (Pgp) Efflux de la Rho B	Induction de l'expression de la Pgp Induction de l'activité d'efflux	Eufemia and Epel, 2000
<i>D. polymorpha</i>	Organisme entier	Animaux transplantés dans un site contaminé	Efflux de la Rho B	Augmentation de l'activité d'efflux après 28 jours d'exposition	Pain and Parant, 2003
<i>C. fluminea</i>	Branchies	Etude terrain : milieu à contamination métallique Exposition au laboratoire au cadmium	Protéine (Pgp)	Corrélation positive entre la pollution et le niveau d'expression de la Pgp Induction de la Pgp par le cadmium à 15 µg/L	Achard et al., 2004
<i>D. polymorpha</i>	Branchies	Etude terrain : milieu à forte contamination en HAP et PCB	Protéine (Pgp)	Expression de la Pgp plus élevée dans le site contaminé	Minier et al., 2006
<i>S. forskali</i>	Branchies Manteau G.digestive	Exposition au laboratoire au Tributyltin acetate (TBT)	Protéines (Pgp, MRP1, BCRP)	Induction de l'expression de Pgp, MRP1 et BCRP par le TBT à 10 et 50 µg/L	Kington et al., 2007

DDE : 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethylene ; HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques ; PCB : polychlorobiphényles ; Rho B: Rhodamine B, G. digestive : Glande digestive

Tableau 7 (suite)

Organisme	Tissu	Nature de la contamination	Paramètres étudiés	Résultats	Références
<i>M. galloprovincialis</i>	Branchies Hémocytes	Exposition au laboratoire au cadmium	Transcrits ABCB1 et ABCC Efflux de la CAM	Surexpression de l'ABCB1 dans les branchies et ABCC dans les hémocytes Induction de l'activité d'efflux dans les hémocytes	Della Torre et al., 2014
<i>C. farreri</i>	Branchies	Exposition au laboratoire au tetrabromobisphenol A et endosul	Transcrit ABCB1	Surexpression de l'ABCB1 après 96h d'exposition	Miao et al., 2014
<i>P. viridis</i>	Branchies	Exposition au laboratoire au dinoflagellé <i>Prorocentrum lima</i>	Transcrit ABCB1	Surexpression de l'ABCB1 après 6h d'exposition	Huang et al., 2014
<i>C. fluminea</i>	Branchies G. digestive	Exposition au laboratoire aux eaux usées des hôpitaux	Transcrit ABCB1	Surexpression de l'ABCB1 à partir de 24h d'exposition	Bonnafé et al., 2015
<i>M. galloprovincialis</i>	-	Etude terrain : milieu à forte contamination métallique	Transcrit ABCB1	Surexpression de l'ABCB1	Ratkaj et al., 2015
<i>D. polymorpha</i>	Organisme entier	Exposition au laboratoire aux sédiments contaminés aux HAPs et aux métaux	Efflux de la Rho B	Induction de l'activité d'efflux après 72h d'exposition	Ács et al., 2015
<i>S. subcrenata</i> <i>T. granosa</i>	Branchies G. digestive Manteau	Exposition au laboratoire au dinoflagellé <i>Prorocentrum lima</i> pendant 24h	Transcrit ABCB1	Pour <i>S. subcrenata</i> , surexpression dans les branchies et la glande digestive Pour <i>T. granosa</i> , surexpression dans les branchies et le manteau	Huang et al., 2015

CAM : Calcéine AM, G. digestive : Glande digestive

Tableau 8. Exemples d'études décrivant l'inhibition du phénotype MXR chez les bivalves par des contaminants chimiques ou biologiques

Organisme	Tissu	Nature de la contamination	Paramètres étudiés	Résultats	Références
<i>M. galloprovincialis</i>	Branchies	Exposition au laboratoire au diesel	Efflux de la G ³ -H vincristine	Inhibition de l'activité d'efflux	Kurelec, 1995
<i>D. polymorpha</i>	Branchies	Etude terrain : milieu contenant des chimiosensibilisateurs	Efflux de la Rhodamine B	Inhibition de l'activité d'efflux	Smital and Kurelec, 1998
<i>P. perna</i>	Branchies	Exposition au laboratoire à la fraction soluble du diesel et à la tributyltine	Efflux de la Rhodamine B	Inhibition de l'activité d'efflux après exposition à 75 et 100% de la fraction soluble du diesel	Jakobi et al., 2012
<i>M. galloprovincialis</i>	Hémocytes	Exposition au laboratoire à la fluoxétine	Transcrit ABCB1	Sous expression de l'ABCB1 après 7 jours d'exposition	Franzellitti and Fabbri, 2013
<i>M. galloprovincialis</i>	Branchies G. digestive	Etude terrain : milieu contenant des toxines algales	Transcrits ABCB1 et mrp2	Inhibition de l'expression de l'ABCCB1 et mrp2	Buratti et al., 2013
<i>C. fluminea</i>	Branchies G. digestive	Exposition au laboratoire à la fluoxétine	Transcrits ABCB1, ABCC1 et ABCG2	Sous expression de tous les gènes après 30 jours d'exposition avec un effet dose-dépendant	Chen et al., 2015

MATERIEL ET METHODE

I. Souches bactériennes

Les bactéries *Vibrio* utilisées dans cette étude ont été isolées à partir d'animaux moribonds lors des épisodes de mortalités de *Mytilus edulis* déclarées par les professionnels en 2010 et 2013 dans le cadre du réseau national français de la surveillance REPAMO (REseau des PATHologies des MOllusques). D'autres souches ont été obtenues à partir de la microflore des moules en absence de mortalités dans le contexte du projet Européen Bivalife en 2011 et 2012.

1. Préparation des suspensions bactériennes

Des précultures des souches de *Vibrio* sont préparées par ensemencement dans 5 ml de milieu MB (Marine Broth) ou LBS (Luria Bertani additionné de NaCl 10g/L) et incubées à 22°C pendant 24h sous agitation (80 rpm). Les bactéries sont ensuite lavées par de l'eau de mer stérile (0,22 µm) et centrifugées 10 min à 20°C à 1200 g. Puis, la charge bactérienne est ajustée à DO 600nm=1 pour les expositions *in vivo*.

Pour les expériences *in vitro*, les bactéries sont diluées dans l'eau physiologique (Na Cl 9g/L) à DO_{600nm}=0.3 correspondant à 10⁸ UFC/ml.

2. Transformation en souches GFP

Les bactéries portant la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) ont été obtenues par conjugaison triparentale. C'est une méthode de transformation qui se base sur l'utilisation de 3 souches bactériennes : donneuse, réceptrice et helper. Le **Tableau 9** récapitule des différentes bactéries utilisées et leurs caractéristiques.

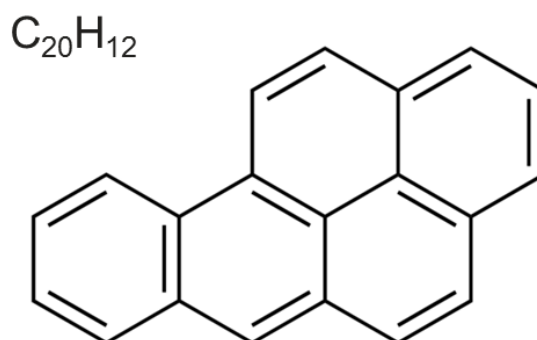
Tableau 9. Caractéristiques des souches utilisées pour la transformation

Souches	Espèces	Description	Résistance	Conditions de culture
10/068 1T1	<i>V. splendidus</i>	Récepteur	Non	milieu LBS à 22°C
12/056 M24T1	<i>V. splendidus</i>	Récepteur	Non	milieu LBS à 22°C
pVSV 102	<i>E. Coli DH5α</i>	Donneur GFP	Kanamycine 40 µg/ml	milieu LB kanamycine 40 µg/ml à 37°C
pEVS104	<i>E. Coli</i>	Helper	Kanamycine 40 µg/ml	milieu LB kanamycine 40 µg/ml à 37°C

Après une culture pendant 24h suivant les conditions décrites dans le **Tableau 9**, un volume de 100 μL de chaque suspension bactérienne (donneur, récepteur et helper) est prélevé et mélangé avec les autres. Le tout est centrifugé pendant 5 min à 3000 g à température ambiante puis le culot bactérien est lavé avec 500 μL de milieu LBS afin d'éliminer toute trace d'antibiotique. Par la suite, les bactéries resuspendues dans 10 μL de LBS sont déposées sur une boîte LBS agar sans étalement et mises en incubation à 28°C pendant 16h. La culture à cette température permet d'éliminer les souches *E. Coli* donneuse et helper. Le tapis bactérien est ensuite récupéré dans un volume de 800 μL d'eau de mer stérile, dilué en série de 10^{-1} à 10^{-4} et mis en culture à 18°C pendant la nuit sur des boîtes de LBSA additionné de kanamycine 100 $\mu\text{g/mL}$. La présence de bactéries GFP est vérifiée le lendemain par microscopie à fluorescence et les clones positifs sont purifiés par étalement sur boîte LBSA kanamycine 100 $\mu\text{g/mL}$ à 22°C.

II. Contaminants chimiques

Le benzo[a]pyrène (BaP) est l'un des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) les plus connus. Il est retrouvé naturellement dans les éruptions volcaniques et les feux de forêt ou encore chez les plantes, les bactéries et les algues. Il peut également avoir une origine industrielle liée au raffinage du goudron, l'utilisation du charbon et du kérosène et la fumée de cigarette.



Le BaP est un mutagène puissant. Facilement absorbé, il est rapidement distribué et métabolisé en réactifs électrophiles capables de se fixer sur l'ADN. Il est classé par l'Union Européenne comme substance cancérogène pour l'homme (catégorie 2) et a également des effets toxiques sur la reproduction ([INRS, 2007](#)).

III. Modèles d'exposition

1. *In vitro*

L'hémolymph est prélevée à partir du muscle adducteur postérieur par douce aspiration en utilisant une seringue de 1 mL munie d'une aiguille 22G. Elle est déposée dans des plaques de 24 puits (Greiner) ou des boîtes 35 mm (corner) et incubée pendant 15 min à 16°C afin de permettre aux hémocytes d'adhérer. La qualité des échantillons est vérifiée par microscopie

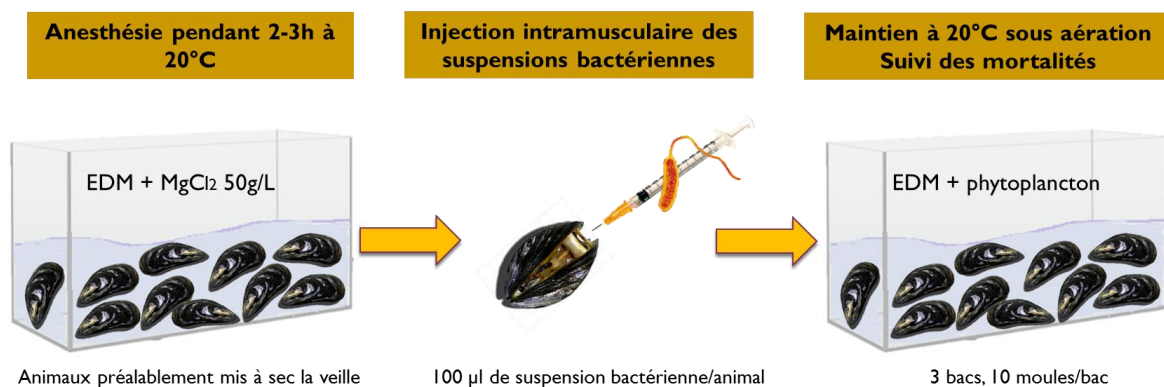
inversée. Les cellules sont ensuite exposées aux bactéries ou aux substances chimiques (inhibiteurs) par contact direct dans les puits ou dans les boîtes. Le tout est incubé à 16°C pendant des courtes durées allant de 30 min à 6 h selon les expériences (jusqu'à 24h pour le test de viabilité).

2. *In vivo*

Les moules sont exposées aux vibrions par injection intramusculaire ou cohabitation et au BaP par balnéation.

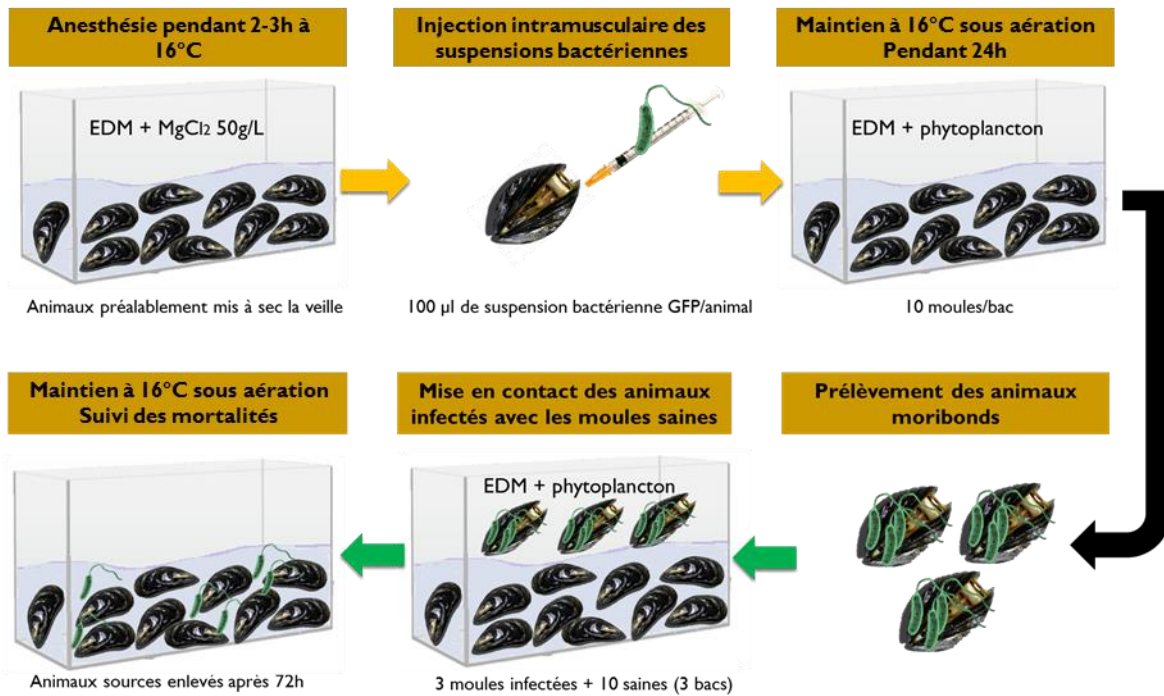
2.1. Injection

Après émergence pendant une nuit, les animaux sont anesthésiés pendant 2 à 3h à 20°C sous aération, dans une solution de chlorure de magnésium 50 g/L (1/4 : V/V eau de mer/ eau douce). Les suspensions bactériennes (ou de l'eau de mer stérile pour les contrôles) sont injectées dans le muscle adducteur postérieur à un volume de 100 µL/ animal. Après injection, les moules sont immédiatement transférées dans des bacs remplis de 2 L d'eau de mer filtrée, sous UV oxygénée et additionnée de phytoplancton (3 bacs à raison de 10 moules/bac). Elles sont maintenues sous des conditions statiques à 20°C avec un suivi de mortalité journalier.



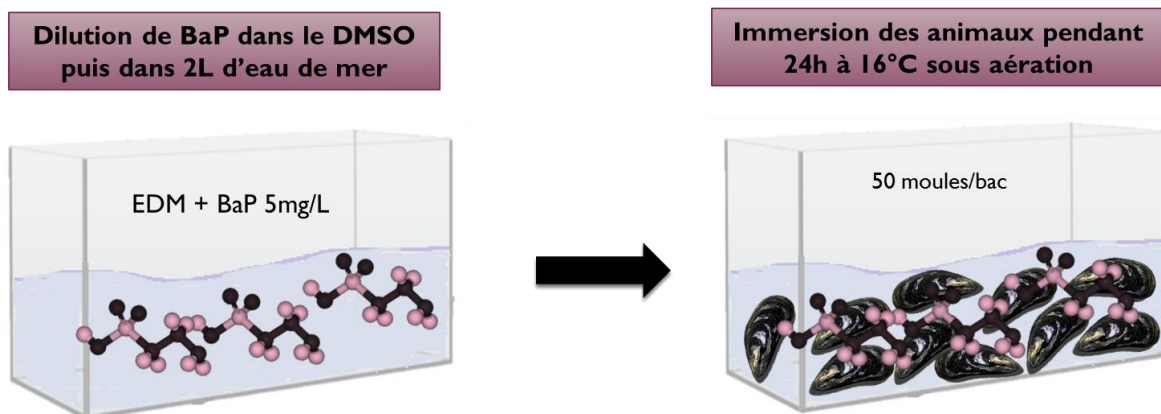
2.2. Cohabitation

Des moules infectées moribondes (selon le protocole décrit ci-dessus) sont mises en contact avec des animaux sains dans des bacs remplis de 2 L d'eau de mer filtrée, sous UV oxygénée et additionnée de phytoplancton (3 bacs à raison de 3 moules infectées en contact avec 10 moules saines). La mortalité est suivie tous les jours et les animaux sources (infectés par injection) sont retirés des bacs après 72h.



2.3. Balnéation

Le BaP dilué dans 500 µl de DMSO à 20°C est rajouté à 2 L d'eau de mer filtrée et sous UV. Après homogénéisation, les moules sont immergées dans l'eau contaminée et maintenues à 16°C sous aération pendant 24 h. Un bac témoin est maintenu dans les mêmes conditions.



RESULTATS

Chapitre 1: étude de l'interaction des souches de *V. Splendidus* et *Mytilus edulis*



Durant les dernières décennies, les bactéries du genre *Vibrio* sont devenues particulièrement pathogènes envers les bivalves, touchant plusieurs espèces à différents stades de vie. Peu affectée par les maladies, la moule bleue semblait avoir une résistance exceptionnelle aux pathogènes. Toutefois, depuis 2010 des mortalités ont été déclarées dans les élevages des Pertuis Charentais et ont permis d'isoler des bactéries appartenant au groupe *V. Splendidus*.

Ce chapitre étudie l'interaction des souches de *V. Splendidus* avec *Mytilus edulis*. L'article 1 fournit une première description de la virulence des isolats bactériens et de leurs effets sur les fonctions hématocytaires *in vitro*. Par la suite, l'article 2 explore les dynamiques d'infection de l'animal par le biais d'un modèle *in vivo*. La Figure 23 résume la démarche expérimentale suivie.

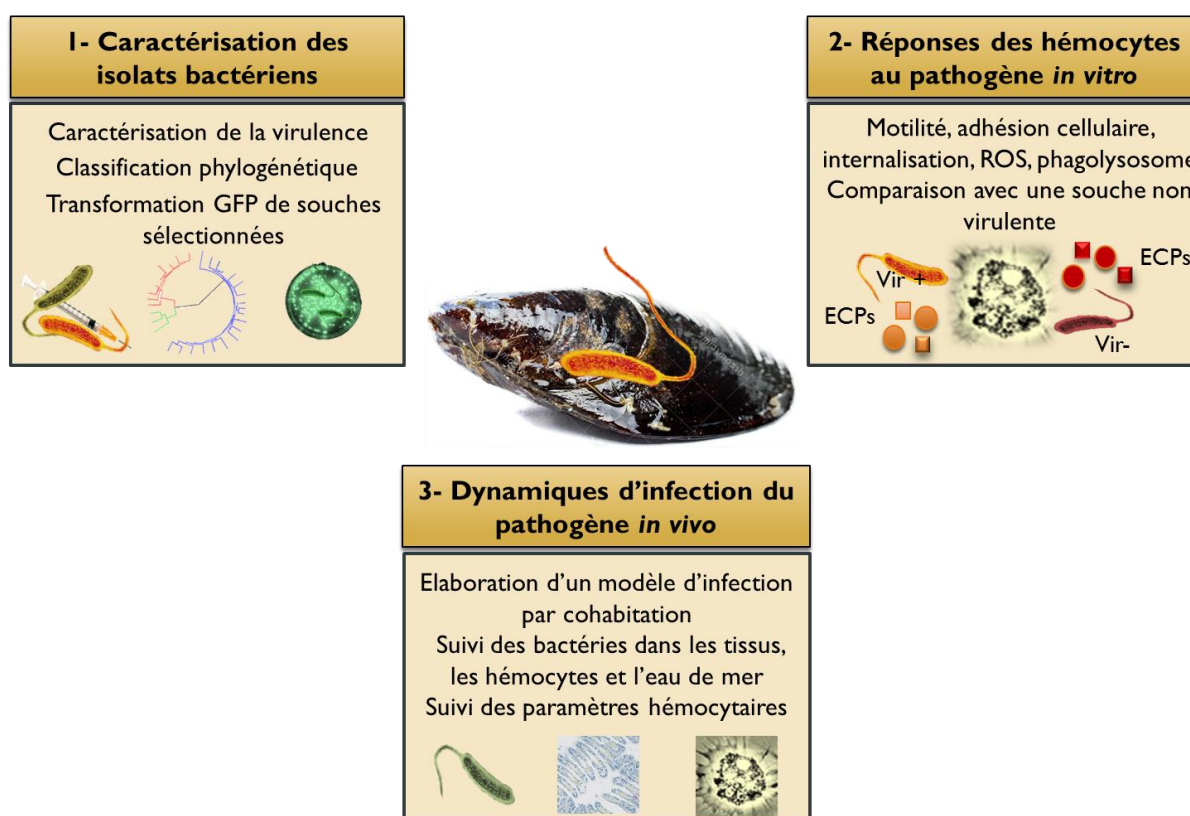


Figure 23. Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale suivie pour l'étude de l'interaction des bactéries de *V. Splendidus* et *M. edulis*

Article 1 : Isolement d'un *Vibrio* pathogène pour la moule bleue et capable d'altérer ses fonctions immunitaires

Journal: *Developmental and Comparative Immunology* (2016)

Cet article présente pour la première fois, 1) une évaluation de la virulence et une caractérisation génétique de souches bactériennes isolées à partir de *Mytilus edulis*, 2) une construction et validation de deux souches stables, différenciellement virulentes exprimant la GFP, et 3) une description des activités fonctionnelles des hémocytes exposés aux bactéries virulentes et non virulentes ou à leur produits extracellulaires.

Les infections expérimentales ont permis la sélection de deux isolats bactériens affiliés à *V. splendidus*/*V. hemicentroti*: une souche virulente codée 10/068 1T1 (76,6% de mortalités à 24h) et une souche inoffensive codée 12/056 M24T1 (pas de mortalités à 24h). Ces deux souches ont été marquées à la GFP et validées en tant que modèles authentiques d'exposition à travers leurs caractéristiques de croissance et de virulence. Ensuite, les réponses cellulaires immunitaires de l'hôte face aux envahisseurs microbiens ont été étudiées *in vitro*. En présence de la souche virulente, la motilité des hémocytes a instantanément augmenté puis a sévèrement ralenti après 2h d'exposition. Par contre, la vitesse cellulaire a continuellement augmenté en présence de la souche inoffensive 12/056 M24T1. Dans le même intervalle de temps, 10/068 1T1 a envahi les hémocytes et a été plus rapidement internalisée que la souche non virulente. De plus, les produits extracellulaires (ECPs) obtenus à partir de la culture de 10/068 1T1 ont significativement inhibé l'activité phagocytaire. La souche pathogène 10/068 1T1 et ses ECPs ont également inhibé la bouffée oxydative contrairement à 12/056 M24T1 ou à ses ECPs qui ont augmenté la production de ROS.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que la souche 10/068 1T1, pathogène pour la moule bleue, peut échapper aux réponses immunitaires de l'hôte en altérant ses fonctions hémocytaires.



Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dciFirst evidence for a *Vibrio* strain pathogenic to *Mytilus edulis* altering hemocyte immune capacitiesYosra Ben Cheikh ^a, Marie-Agnès Travers ^b, Benjamin Morga ^b, Yoann Godfrin ^b, Damien Rioult ^c, Frank Le Foll ^{a,*}^a Laboratory of Ecotoxicology- Aquatic Environments, UMR-I 02, SEBIO, University of Le Havre, F-76063, Le Havre Cedex, France^b Ifremer, SG2M-LGPMM, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Avenue de Mus de Loup, 17390, La Tremblade, France^c Laboratory of Ecotoxicology- Aquatic Environments, UMR-I 02, SEBIO, University of Reims Champagne Ardenne, Campus Moulin de la Housse, F-51100, Reims, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2015

Received in revised form

17 December 2015

Accepted 17 December 2015

Available online 21 December 2015

Keywords:

Innate immunity

Molluscs

Cell-mediated immune response

Bacterial infections

Green fluorescent protein

ABSTRACT

Bacterial isolates were obtained from mortality events affecting *Mytilus edulis* and reported by professionals in 2010–2013 or from mussel microflora. Experimental infections allowed the selection of two isolates affiliated to *Vibrio splendidus*/*Vibrio hemicentroti* type strains: a virulent 10/068 1T1 (76.6% and 90% mortalities in 24 h and 96 h) and an innocuous 12/056 M24T1 (0% and 23.3% in 24 h and 96 h). These two strains were GFP-tagged and validated for their growth characteristics and virulence as genuine models for exposure. Then, host cellular immune responses to the microbial invaders were assessed. In the presence of the virulent strain, hemocyte motility was instantaneously enhanced but markedly slowed down after 2 h exposure. By contrast, hemocyte velocity increased in the presence of the innocuous 12/056 M24T1. At the same time interval, 10/068 1T1 invaded hemocytes and was more rapidly internalized than the innocuous strain. Extracellular products (ECPs) prepared from 10/068 1T1 cultures significantly inhibited phagocytic activity while 12/056 M24T1 ECPs had no effect. Furthermore, the pathogenic strain and its ECPs inhibited oxidative burst unlike 12/056 M24T1 strain/ECPs which enhanced ROS production. Taken together, our results suggest that the mussel pathogen 10/068 1T1 may escape immune response by altering hemocytes functions.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Shellfish farms have been impacted by bacterial infectious diseases for many years, inducing repeated episodes of mortality and consequently important economic loss. The most common causative agent is represented by members of the genus *Vibrio* capable of infecting oysters, abalone, clams, and scallops at different life stages: larval, juvenile and adult (Beaz-Hidalgo et al., 2010a; Travers et al., 2015). Among bivalve species and until recently, mussels were not massively affected by bacterial pathogens (Gestal et al., 2008; Watermann et al., 2008). This relative resistance has been related to a robust innate immunity able to prevent efficiently bacteria infestation (Balbi et al., 2013; Ciacci et al., 2010; Tanguy et al., 2013). Nevertheless, since 2010, abnormal mortality events were also reported for farmed blue mussels (juveniles and adults)

in France (Bechemin et al., 2014; Guichard et al., 2011). During this period, different *Vibrio* strains were isolated from moribund animals. Primary investigations on recent mortality events suggest that these episodes could be accounted for by multiple reasons, including a combination of particular environmental conditions together with biological factors (Bechemin et al., 2014).

Host-pathogen interactions implicate multiple processes initiated both by the pathogen, as a strategy to survive, and the host in an attempt to eliminate the invader (Gestal et al., 2008). Whilst *Vibrio* virulence has been frequently associated to secretion of extracellular products (Labreuche et al., 2010, 2006), lesions and infection kinetics remain poorly understood because of the diversity of bacteria and the number of hosts and age classes they can infect (Travers et al., 2015). The study of immune systems may help to understand responses of hosts facing invaders. As other bivalves, mussels are endowed of exclusive innate immune responses carried out by circulating hemocytes and soluble hemolymph factors (Canesi et al., 2002).

* Corresponding author.

E-mail address: frank.lefoll@univ-lehavre.fr (F. Le Foll).<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.014>

0145-305X/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Mytilus edulis immunocytes form a heterogeneous cell population. They can be classified into 3 main groups of hemocytes, small semi-granular basophils, agranular hyalinocytes and more complex granulocytes (Le Foll et al., 2010). These cells are involved in various physiological functions but their key role consist in internal defense since they are able to recognize, bind, and phagocytize microbes. Phagocytosis is the primary mechanism for bacterial killing and elimination of foreign particles in these organisms. It can be divided into several stages, including chemotaxis, recognition, adhesion, endocytosis and destruction (Gosling, 2015). Mussel hemocytes are motile, they migrate to infected sites following the detection of foreign materials (Donaghy et al., 2009), leading to pathogens recognition and adhesion. Internalization is the key stage of microbicidal activity. During this process, sophisticated cascades of reactions involving multiple molecular partners take place. As a consequence, phagocytes produce free radicals derived from oxygen and nitrogen, highly toxic to the ingested pathogens, and release lysosomal enzymes as well as antimicrobial peptides (Canesi et al., 2002; Mitta et al., 2000).

Nevertheless, the immune response is sometimes insufficient to defeat microbial aggressions. Bacteria can be pathogenic to host, having the ability to cause diseases and death. The degree of pathogenicity corresponds to virulence, a phenotype intimately dependent on host–pathogen interactions (Casadevall and Pirofski, 2009; Steinhaus and Martignoni, 1970). Experimental infections of *Mytilus* sp. and *in vitro* studies using hemocytes co-incubated with various *Vibrios* have generated data describing systemic, cellular and molecular responses of mussels to bacteria (Ciacci et al., 2010, 2009; Costa et al., 2009; Parisi et al., 2008; Tanguy et al., 2013). However, bacterial strains used in these studies, like *Vibrio splendidus* LGP32 or *Vibrio aestuarianus* 01/132, are pathogens of the pacific oyster *Crassostrea gigas* with, by contrast, no characterized virulence towards the blue mussel. Thus, it should be considered that, up to now, results reported from bacterial challenges of *Mytilus* sp. immunity were obtained in a context of low virulence.

In this work, we evaluated the virulence of bacterial isolates in the adult blue mussel by carrying out experimental infections and characterizing hemocyte responses. Experimental infections led to the selection of two isolates affiliated to *V. splendidus*/*V. hemi-centroti* groups: a virulent and an innocuous strain. Corresponding GFP-tagged *Vibrio* strains were constructed and validated to be used in flow cytometry and fluorescence microscopy. Responses of blue mussel hemocytes exposed to virulent/non virulent *Vibrio* strains or to their extracellular products during different phases of phagocytosis were examined.

2. Material and methods

2.1. Mussel collection

Adult mussels, *M. edulis* with shell length ranging from 4 to 5 cm, were collected on the intertidal rocky shore of Yport (0°18'52"E:49°44'30"N, France) between December 2013 and December 2015, immediately transported to the laboratory and placed in a temperature-controlled (10 °C) aerated Biotop Nano Cube 60 seawater tank (Sera, Heinsberg, Germany), equipped with mechanical and activated biological filtering. The animals were fed with algae (*Isochrysis galbana*) and maintained in these conditions for at least one week before use.

2.2. Bacterial strains

2.2.1. Isolation from mussels (Laboratoire National de Référence, LNR, La Tremblade)

Strains used in this study are described in Table 1. Bacteria were

isolated from mussel mortality events reported by professionals (French national surveillance network REPAMO) in 2010 and 2013, or from mussel microflora in absence of mortality in the context of Bivalife European project in 2011 and 2012. Briefly, crushed tissues were homogenized in 100 µl of Sterile Artificial Sea Water (SASW: 2.3% (w/v) NaCl, 20 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂) with a sterile pellet-pestle (Sigma) for 1 min on average. Samples diluted 100× and 1000× in SASW were plated on Zobell agar (0.4% peptone, 0.1% yeast extract, 0.01% ferric citrate and 1.5% agar in SASW, pH 7.6) and the predominant bacteria were isolated after 48 h at 20 °C. Pure cultures of bacterial strains were conserved frozen at –80 °C in Zobell broth with glycerol 15%.

2.2.2. Genetic characterization: *gyrB* sequencing

Total DNA from a log-phase culture was extracted from cultured *Vibrio* by boiling in 100 µl of ultrapure water (Saulnier et al., 2009). The *gyrB* (gyrase B) gene was amplified using the universal bacterial primer pairs (*gyrB*274F GAAGTTATCATGACGGTACTTC and *gyrB*1171R CCTTTACGACGAGTCATTTC) and the methods previously described (Thompson et al., 2005). Amplicons with the expected size were purified using a Microcon PCR filter kit (Millipore). Purified PCR products were mixed (final volume 10 µl) with 0.4 µl ABI Prism Big Dye Terminator ready reaction mix (Applied Biosystems®) and 0.75 µM of primer. Cycle sequencing reactions were performed using a Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems®) and following the manufacturer's instructions. Separation of the DNA fragments was carried out in an ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Sequences were aligned using ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and BioEdit software (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Phylogenetic tree was built using Mega6 (<http://www.megasoftware.net/mega6/mega.html>). The tree was drawn using the Neighbor-Joining method with the Kimura two-parameter model (Saitou and Nei, 1987). Reliability of topologies was assessed by the bootstrap method (Felsenstein, 1985) with 1000 replicates. The Genbank accession numbers gene sequences obtained in this study or already published in GenBank are presented in Table 2.

2.2.3. Characterization of virulence by *in vivo* injections

Bacteria were grown overnight in Marine broth or Luria Bertani NaCl 20 g L⁻¹ at 22 °C with constant agitation (80 rpm). Cells were washed twice with filtered sterile seawater (FSSW) and centrifuged at 1200 g for 10 min. The supernatant was discarded and the resulting pellet resuspended in FSSW to obtain an OD_{600nm} of 1. Mussels were anesthetized for 2–3 h at 20 °C in a magnesium chloride solution (MgCl₂, Sigma Aldrich) at a final concentration of 50 g L⁻¹ (1/4: v/v seawater/freshwater) and under aeration. Subsequently, a volume of 100 µl of bacterial suspension was injected into the posterior adductor muscle. A group of mussel was injected with FSSW to serve as negative controls. After injection, the animals were transferred to tanks (3 replicate tanks, 10 mussels per tank) filled with 2L of UV-treated and filtered seawater supplemented with 50 mL of phytoplankton and maintained under static conditions at 20 °C with aeration. Mortality was monitored each day over a four day period. Animals were considered to be dead when the valves did not close following stimulation. Newly dead mussels were removed from the tanks.

2.2.4. GFP-tagging by triparental mating

The pVSV102 plasmid (Dunn et al., 2006) carrying GFP/kanamycin-resistance expression cassette was transferred from *Escherichia coli* to *Vibrio* strains (10/068 1T1, 12/056 M24T1) by triparental mating (Stabb and Ruby, 2002) using the conjugative helper strain CC118 λpir as described by Dunn et al. (2006). Donor,

Table 1

Strains used in this study.

Strain	Isolation from	Context	Date
10/058 2T1	Mussel, baie de Somme (80) France	Mussel mortality	2010, May 18
10/058 3T1	Mussel, baie de Somme (80) France	Mussel mortality	2010, May 18
10/060 2T1	Mussel, baie d'Authie (62) France	Mussel mortality	2010, May 19
10/068 1T1	Mussel, baie de Camaret (29) France	Mussel mortality	2010, May 31
11/100 M22T3	Mussel, d'Agnas (17) France	Absence of mortality	2011, June 29
11/148 M6T2	Mussel, d'Agnas (17) France	Absence of mortality	2011, October 11
12/037 M22T1	Mussel, d'Agnas (17) France	Absence of mortality	2012, May 22
12/037 M23T1	Mussel, d'Agnas (17) France	Absence of mortality	2012, May 22
12/037 M24T1	Mussel, d'Agnas (17) France	Absence of mortality	2012, May 22
12/037 M7T1	Mussel, d'Agnas (17) France	Absence of mortality	2012, May 22
12/040 11T2	Mussel, Oye Plage (62) France	Mussel mortality	2012, May 24
12/056 M1T1	Mussel, d'Agnas (17) France	Absence of mortality	2012, June 05
12/056 M24T1	Mussel, d'Agnas (17) France	Absence of mortality	2012, June 05
13/026 2T3	Mussel, Oye Plage (62) France	Mussel mortality	2013, April 08
13/026 5T3	Mussel, Oye Plage (62) France	Mussel mortality	2013, April 08

Table 2

Gyrase B gi reference.

gi number	Reference strains
gi164456642	<i>Vibrio brasiliensis</i> strain LMG 20546T
gi164456646	<i>Vibrio chagasii</i> strain LMG 21353T
gi164456648	<i>Vibrio cholerae</i> strain IID 6019
gi164456652	<i>Vibrio crassostreae</i> strain LMG 22240T
gi164456656	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> strain LMG 21359T
gi164456666	<i>Vibrio fortis</i> strain LMG 21557T
gi164456672	<i>Vibrio gigantis</i> strain LMG 22741T
gi164456684	<i>Vibrio kanaloae</i> strain LMG 20539T
gi164456686	<i>Vibrio lentus</i> strain LMG 21034T
gi164456718	<i>Vibrio pomeroyi</i> strain LMG 20537T
gi164456730	<i>Vibrio splendidus</i> strain LMG 19031T
gi164456734	<i>Vibrio tasmaniensis</i> strain LMG 20012T
gi164456742	<i>Vibrio xuii</i> strain LMG 21346T
gi164456742	<i>Vibrio artabrorum</i> strain CAIM 1845 T
gi164456742	<i>Vibrio atlanticus</i> strain CAIM 1847 T
gi164456742	<i>Vibrio celticus</i> strain CAIM 1849 T
gi164456742	<i>Vibrio gallaecicus</i> strain CECT 7244T
gi164456742	<i>Vibrio toranzoniae</i> strain CAIM 1869 T
KU145472	10/058 2T1
KU145473	10/058 3T1
KU145474	10/060 2T1
KU145475	10/068 1T1
KU145476	11/100 M22T3
KU145477	11/148 M6T2
KU145478	12/037 M22T1
KU145479	12/037 M23T1
KU145480	12/037 M24T1
KU145481	12/037 M7T1
KU145482	12/040 11T2
KU145483	12/056 M1T1
KU145486	12/056 M24T1
KU145484	13/026 2T3
KU145485	13/026 5T3

helper and receptor cells were grown overnight to the stationary phase in Luria Bertani (LB) (*E. coli* strains) and LBS [LB complemented with salt, NaCl 20 g L⁻¹ (f.c.), for *Vibrio* strains] with addition of 40 µg mL⁻¹ kanamycin for DH5α-pVSV102. 100 µL of each culture was combined in a microfuge tube, washed in LBS without antibiotics and centrifuged at 1200 g for 10 min. The resulting pellet was suspended into 10 µL of LBS and dropped on a fresh LBS agar plate and then incubated for 16 h at 28 °C. The bacterial spot was suspended in 800 µL of LBS, serially diluted, plated on LBS plates containing 100 µg L⁻¹ kanamycin and incubated at 18 °C. Donor bacteria were counter-selected by growing at 18 °C, whereas the helper strain and the acceptor strain, which did not receive conjugative plasmids were killed by the antibiotic selection. Therefore, clones were isolated by inoculation into new LBS

antibiotic plates and green fluorescent were verified by epifluorescence microscopy.

2.2.5. Validation of GFP-tagged strains

2.2.5.1. GFP expression conservation. To ensure plasmid conservation, fluorescent bacteria strains were grown overnight in LBS 100 µg L⁻¹ kanamycin at 22 °C. This culture was diluted in LBS without antibiotics and grown at 22 °C overnight. Every day, a new culture was started with an aliquot of the previous day's culture, which was analyzed by flow cytometry, after dilution.

2.2.5.2. Growth curves. Parental bacterial strains and GFP-tagged strains were cultivated in LBS at 22 °C with constant shaking at 80 rpm. At regular intervals, the bacterial concentrations in the cultures were evaluated spectrophotometrically at an optical density (OD) of 600 nm.

2.2.5.3. In vivo injection. To compare virulence between parental and derivative fluorescent strains, GFP-tagged strains were injected intramuscularly into mussels according to the protocol described above for parental strains.

2.3. Contact with hemocytes

2.3.1. Haemolymph collection

Haemolymph was withdrawn from the posterior adductor muscle sinus, by gentle aspiration with a 1 mL syringe equipped with a 22G needle. Quality of samples was systematically checked by microscopic observation before using in bioassays.

2.3.2. Preparation of bacteria and their extracellular products

For *in vitro* experiments, two *Vibrio* strains were used: 10/068 1T1 and 12/056 M24T1 (parental or GFP-tagged). Bacteria were cultivated overnight in Marine broth or Luria Bertani NaCl 20 g L⁻¹ at 22 °C, centrifuged at 3000 g for 10 min. Supernatants were filtered (0.22 µm) and conserved at -20 °C until use and bacteria were diluted in sterile physiological water (NaCl 9 g L⁻¹) at 10⁸ cfu mL⁻¹ for immediate utilization.

2.3.3. Motility

Hemocyte motility was assessed via live-cell nuclei tracking. The protocol was adapted from Rioult et al. (2013). Briefly cells exposed to bacteria (10⁸ cfu mL⁻¹) or in marine physiological saline solution (MPSS) pH 7.8, 0.2 µm filtered (Rioult et al., 2014) for the control were incubated with 5 µM of the nuclei-specific fluorescent probe Hoechst 33342 for 15 min at 15 °C. A culture dish was placed on the stage of a TE-2000 inverted microscope (Nikon, Champigny-sur-

Marne, France) equipped for epifluorescence excitation (HBO arc lamp with 377/50 nm bandpass filter) and time-lapse imaging. A Peltier temperature controller (PDMI-2 and TC-202A; Harvard Apparatus, Holliston, MA) keeps preparation at 15 °C for extended live cell imaging. Wild-field epifluorescence time-lapse imaging was performed with a $\times 10$ objective (numerical aperture 0.3). A VCM-D1 shutter (Uniblitz, Vincent Associates, NY) was added in the illumination pathway to cut off the excitation light between two image recordings. Camera and shutter were controlled by Metamorph (Molecular Device, Sunnyvale, CA) as acquisition software. A CCD Coolsnap EZ camera (Photometrics, Tucson, AZ) captured 12-bit digital of 1392×1040 pixels greyscale images every 30 s for 2 h (409 nm long path emission filter). Camera and software were calibrated to express distance in microns. Time-series image stacks were imported into Metamorph Analysis software. The track Objects application (available with Multi-Dimensional Motion Analysis option) was started. Typically, for each biological replicate, 20 nuclei were randomly chosen to be tracked. Extracted data were transferred to a spreadsheet and, for each cell, the mean distance travelled during 30 s was calculated and multiplied by 2 to express velocity in $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$.

Supplementary video related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.014>.

2.3.4. Phagocytosis assay

The phagocytic ability of hemocytes was determined by flow cytometry using fluorescent beads or GFP tagged bacteria. Internalization of beads or bacteria was verified by microscopic observation.

The protocol was adapted from Costa et al. (2009) with some modifications. Briefly, fluospheres (Fluosphere Carboxylate-Modified Microspheres, 2.00 μm , yellow-Green, Life technologies) were added to haemolymph to generate minimally a 10:1 bead to hemocyte ratio and cells were incubated for 2, 4 and 6 h at 15 °C in the dark. The effect of bacterial extracellular products (ECPs) was tested by mixing 100 μl of ECPs to cell suspension one hour before adding beads. After incubation, supernatants were gently aspirated and attached cells were removed by adding cold Alsever's solution (300 mM NaCl, 100 mM Glucose, 30 mM sodium Citrate, 26 mM citric acid, 10 mM EDTA, pH 5.4) and analyzed by Beckman Coulter flow cytometer. Phagocytosis was defined as cell internalization of 3 beads or more.

The capacity to phagocyte bacteria was also evaluated. Cells were exposed to GFP-tagged *Vibrio* strains at 10:1 ratio (bacteria:cell) for 2, 4 and 6 h at 15 °C in the dark. Before analysis on flow cytometry, propidium iodide was added to quantify the percentage of viable cells.

2.3.5. ROS production

Crude haemolymph was placed into individual wells of 24-well tissue-culture plates (Greiner) and cells allowed to adhere for 15 min at 15 °C. The haemolymph was removed and replaced with 400 μl MPSS (0.2 μm filtered) alone for the control or containing 0.2 μM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) or 100 μl of ECPs or heat killed bacteria (15 min at 100 °C). For *Vibrio* challenges, 400 μl of bacterial suspension diluted in physiological water at 10^8 cfu ml^{-1} were added to hemocytes. After two hours of incubation at 15 °C, CM-H₂DCFDA at 0.2 μM f.c. was added in each well and plates were incubated 30 min at 15 °C in the dark. Fluorescence was analyzed on flow cytometer (Beckman Coulter).

2.4. Statistical analyses

Statistical analysis was performed by using SigmaPlot 12 (Systat Software Inc., Chicago, IL). Replicates were averaged and the values

were tested for normality (Shapiro–Wilk) and paired comparisons were performed by Student's t-tests or by Mann–Whitney rank sum tests in case of unequal variance. Statistical significance was accepted for $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ or $***p < 0.001$.

3. Results

3.1. Bacteria pathogenicity and genetic characterization

Bacterial strains were isolated from *M. edulis* during mortalities events reported by professionals or from mussel microflora in absence of mortalities (Table 1). Fifteen strains of *Vibrio* isolates were tested at $\text{OD}_{600} = 1$ for their pathogenicity toward mussels by experimental infection (Fig. 1). First mortalities appears 24 h post-injection and were comprised between 0% and 76.6% indicating different degrees of virulence between bacteria. The most virulent strain was 10/068 1T1 and caused respectively $76.6 \pm 8\%$ and $90 \pm 5\%$ ($n = 3$) mortalities after 24 and 96 h. For 10/060 2T1 and 12/040 11T2 mortalities increased progressively from 5 to 10% after 24 h to 40–47.5% after 96 h. Strains 10/058 2T1, 10/058 3T1, 11/100 M22T3, 11/148 M6T2, 12/037 M22T1, 12/037 M24T1, 12/037 M7T1, 12/037 M23T1, 12/056 M1T1, 12/056 M24T1, 13/026 2T3, 13/026 5T3 can be considered as innocuous (mortalities between 0 and 6.6% after 24 h). It is important to notice that some of these strains can induce limited mortalities after 96 h.

To confirm the virulence of 10/068 1T1 strain, different OD_{600} doses were injected to mussels (Fig. 2). After 24 h, a dose-dependent mortalities was observed ($36.6 \pm 12\%$, $n = 3$ mortalities at $\text{OD}_{600} = 0.1$).

Phylogenetic analyses of bacteria isolates based on the house-keeping gene *gyrB* revealed that the majority of isolated strains belongs to *V. splendidus* group and can be affiliated to the *V. splendidus/V. hemicentroti* species, or *Vibrio lentus/V. atlanticus* species (Fig. 3). No clear correlation between phylogeny and virulence can be noticed. Conversely, few virulent strains (3) were identified, all isolated from mussel mortality events (2010 and 2012), and phylogenetically close to non virulent strains isolated from normal flora.

3.2. Validation of GFP-tagged strains

Two *Vibrio* strains were GFP-tagged, the virulent 10/068 1T1 and the non virulent 12/056 M24T1. To validate their use as genuine models for *M. edulis*, the fluorescence stability and potential effects of the GFP-plasmid on bacteria growth capacities and virulence were analyzed. Plasmid stability tests, determining the proportion of plasmid-bearing cells remaining overtime, were conducted by culturing the GFP-labeled strains in the absence of antibiotic selection. Both strains 10/068 1T1 and 12/056 M24T1 showed a high stability of GFP encoding plasmid after 14 passages in a non-selective culture (Fig. 4a). Bacterial physiology and phenotype after GFP-tagging were also studied. No obvious difference was noticed in growth characteristics (Fig. 4b) and colony size or aspect when plated on LBS (not shown). Furthermore, bacteria virulence did not change after transformation, both parental and GFP-tagged 10/068 1T1 strains leading to 90% mussel mortality in 4 days while parental and labeled 12/056 M24T1 strains caused in this experiment respectively 20% and 23% mortalities (Fig. 4c).

3.3. Hemocyte motility

Hemocyte migration was followed *in vitro* by nuclei tracking during 2 h with a recording rate of 1 image/30 s. Off-line tracking was carried out on a set of 20 nuclei selected randomly in the microscopic field. In control conditions, velocity was stable with

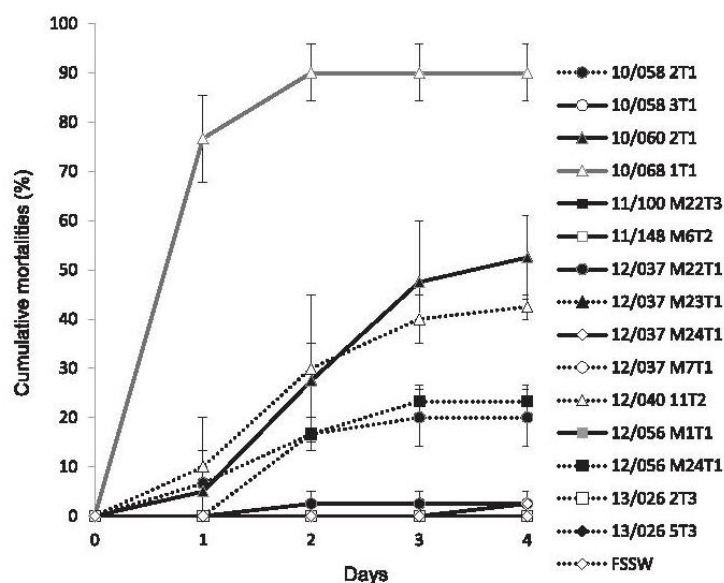


Fig. 1. Cumulative mortalities recorded after experimental bacterial infections of adult mussels. Bacterial strains were grown for 24 h in Marine broth before resuspension into filtered sterile seawater (FSSW) and adjustment to $OD_{600} = 1$. One hundred microliters of bacterial suspension were injected intramuscularly to anesthetized mussels (10 animals/replicate). Mussels injected with FSSW were used as control. Data are means $\pm$ SEM of cumulative mortalities triplicate tanks.

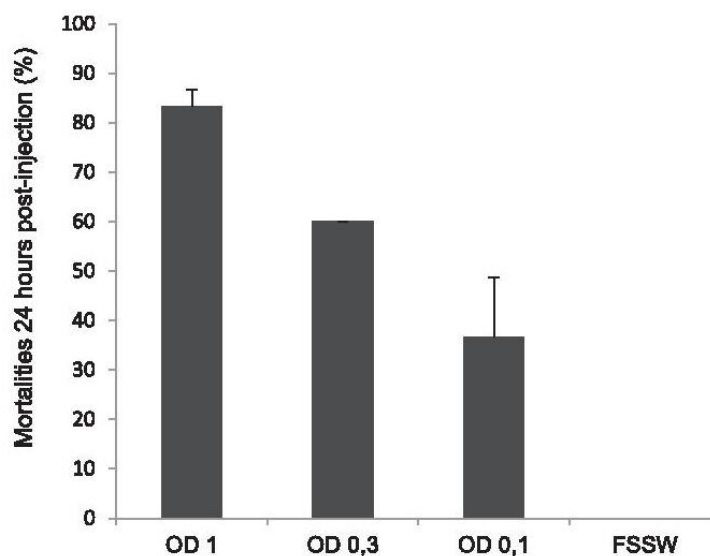


Fig. 2. Effect of inoculum size on mussel mortality. Dose-response effect of *V. splendidus*-related strain 10/068 1T1 on adult mussels estimated 24 h post-injection. Mussels injected with FSSW were used as control. Data are means $\pm$ SEM of triplicate tanks.

values of about $1 \mu\text{m}/\text{min}$. In the presence of *V. splendidus*-related 10/068 1T1 in the imaging chamber, cell velocities were higher, $3.3 \mu\text{m}/\text{min}$ at the beginning of the recording, and increased after 30 min to reach $4.8 \mu\text{m}/\text{min}$. Then, migration speed decreased and get closer to control velocity after 2 h of recording. In contrast, the motility of hemocytes exposed to the innocuous strain 12/056 M24T1 increased progressively and exceeded $5 \mu\text{m}/\text{min}$ at the end

of the recording (Fig. 5a). Standard error of the mean (SEM) values followed the same distribution than mean velocity (Fig. 5b). These results indicate that hemocytes co-incubated with *V. splendidus*-related 10/068 1T1 had transiently elevated velocities at the beginning of the experiments and rapidly converged towards a reduced motility in a bell-shaped time course. Conversely, 12/056 M24T1 continuously activated hemocyte speed during motility

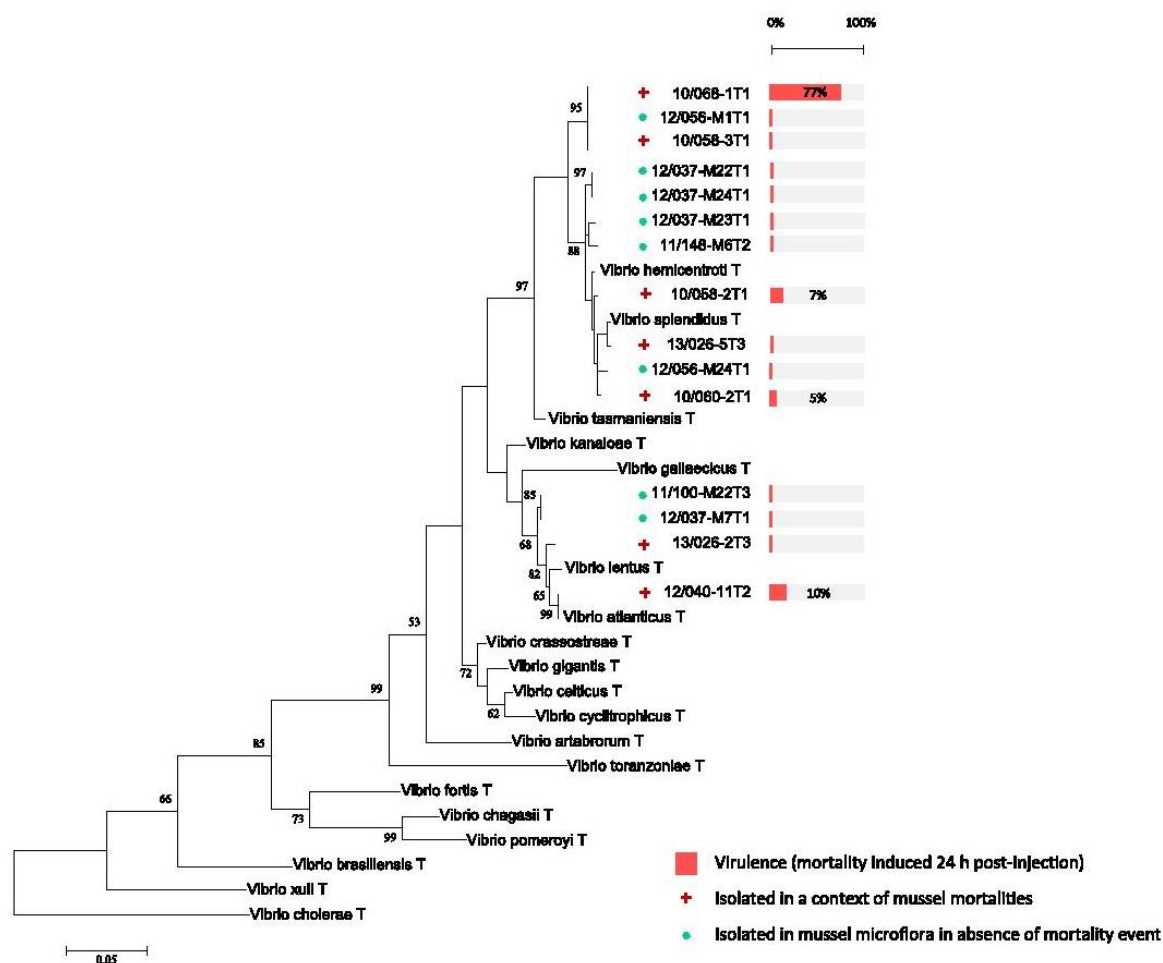


Fig. 3. Phylogenetic analysis of bacteria strains based on *gyrB* gene sequencing. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The analysis was carried out by the neighbor-joining method on 34 nucleotide sequences and 529 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6. Virulence of bacteria, assessed by the percentage of mortality induced 24 h post-injection is indicated by the horizontal bars.

recordings and provoked a dispersion of single-cell velocities.

3.4. Phagocytosis assays

The ability of hemocytes to engulf latex beads was investigated at different time intervals (Fig. 6); the percentage of cells containing 3 or more beads increased with incubation time and ranged from 40% at 2 h to 56% at 6 h. The preincubation with 10/068 1T1 ECPs altered significantly the phagocytic capacity at 2 h with a decrease from 40% to 22% and also at 4 h and 6 h ($p < 0.05$). 12/056 M24 T1 ECPs did not affect phagocytosis by comparison to control.

The phagocytic capacity of bacteria was evaluated by challenging hemocytes with virulent and non-virulent strains at different exposure time (Fig. 7). The percentage of cells containing one bacterium was significantly higher for hemocytes exposed to 12/056 M24T1 than 10/068 1T1, and rates decreased at 6 h. However, cells engulfed 2 bacteria and more were significantly less important for 12/056 M24T1 than 10/068 1T1 and an increase was

observed after 6 h exposure. Furthermore, during phagocytosis hemocytes were viable at 95% for both strains (data not shown).

3.5. ROS production

The capacity of *M. edulis* hemocytes to produce reactive oxygen species was investigated by *in vitro* exposure to a chemical activator used as a positive control (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) and bacterial strains (living or heat killed) or their extracellular products (ECPs) (Fig. 8). Immunocytes respond actively and significantly to all treatments. PMA activated a respiratory burst at very low concentration (0.2 μ M), demonstrating that mussel hemocytes are able to produce toxic radicals. Bacterial strains or corresponding ECPs also induced ROS production. However, significant differences were obtained according to experimental conditions. Hemocyte exposure to non virulent *Vibrio* (12/056 M24T1) or to 12/056 M24T1 ECPs activated ROS production at levels similar or higher than PMA, respectively. Conversely, when

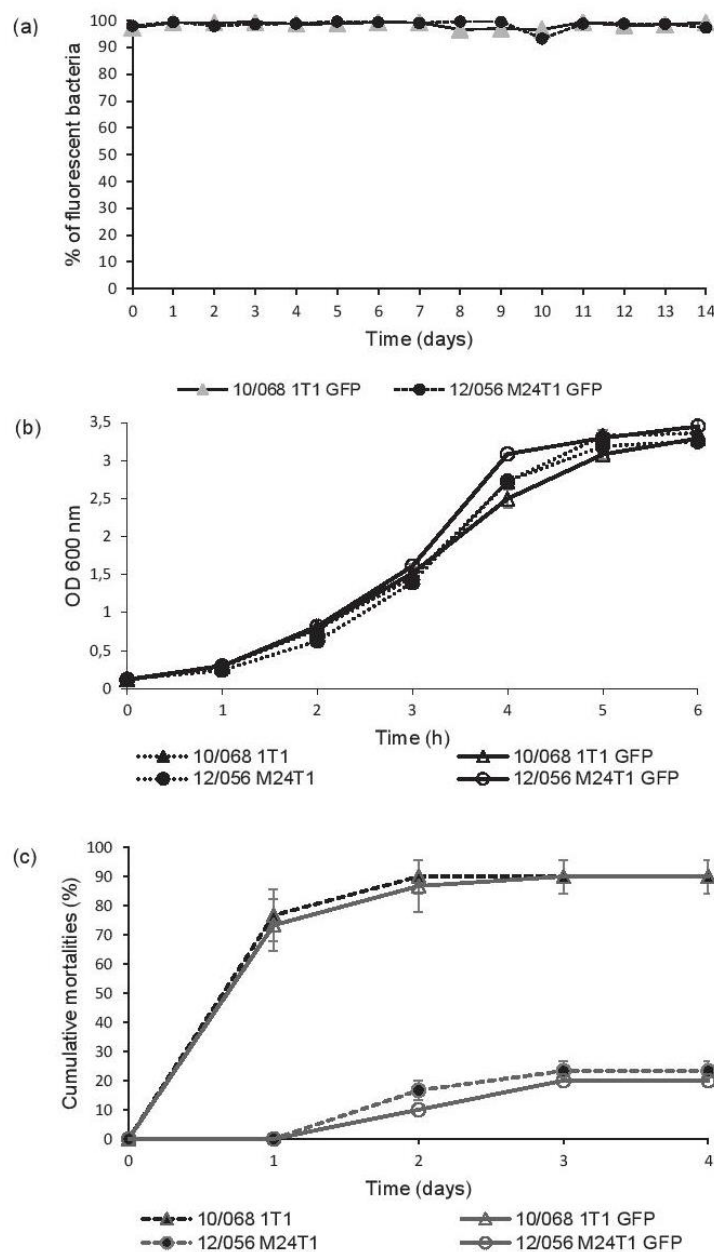


Fig. 4. Plasmid expression stability in *Vibrio* strains and effect of GFP expression on growth capacities and virulence. (a) Fluorescence conservation in GFP-tagged bacteria over time. Strains were cultivated in non-selective LBS medium and fluorescence was estimated by flow cytometry. (b) Growth curve of parental and GFP-tagged bacteria at 22 °C in LBS medium ($n = 3 \pm \text{SEM}$). (c) Comparison of virulence capacity of parental and GFP-tagged strains on adult mussels ($n = 3 \pm \text{SEM}$).

exposed to the strain 10/068 1T1 or its ECPs, hemocytes generated oxygen radicals at amounts significantly inhibited by comparison to PMA-stimulated levels without any reduction of cell viability (data not shown). Heat-killed 10/068 1T1 did not significantly modify the response compared to PMA.

4. Discussion

Unlike other bivalve species, *M. edulis* is not known to be particularly affected by any major bacterial disease (Beaz-Hidalgo et al., 2010a; Travers et al., 2015; Watermann et al., 2008). It has been suggested that mussel resistance to bacterial infection was

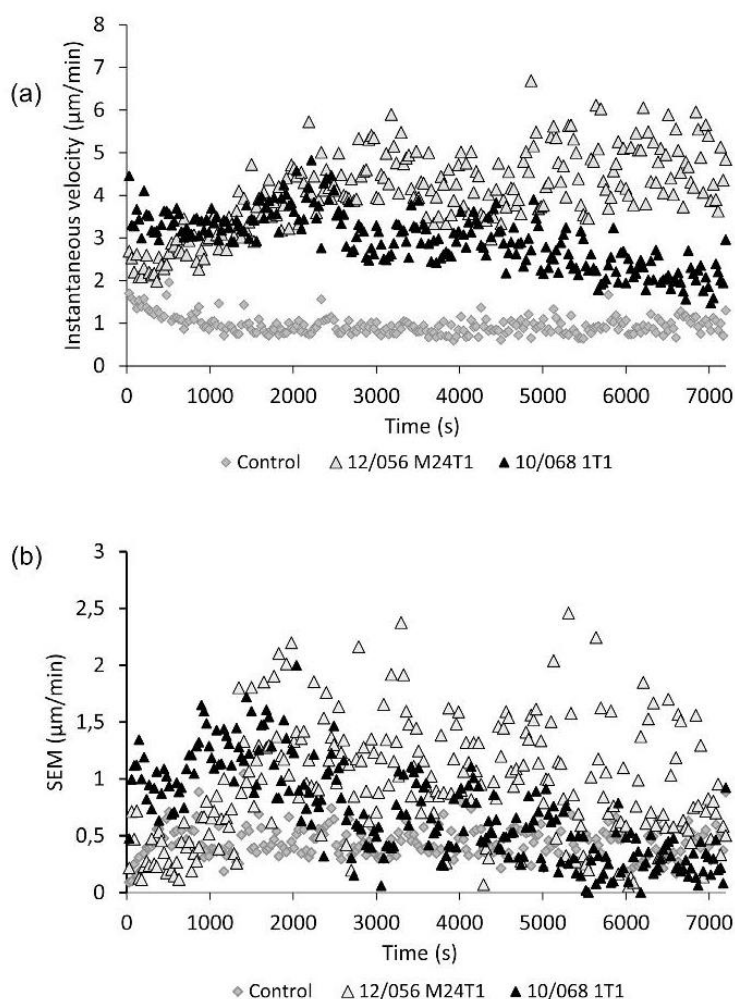


Fig. 5. Effect of *V. splendidus*-related strains on hemocyte motility. *M. edulis* hemocytes were challenged by *V. splendidus*-related strains 10/068 1T1 or 12/056 M24T1 at 10^6 cfu ml^{-1} or incubated in MPSS (control) during 2 h at 15°C . (a) Mean velocity of 60 nuclei (3 independent experiences) obtained from centroid XY coordinate changes in the microscopic field between two successive images, separated by 30 s. (b) Standard errors of the mean taken from (a).

due to the presence of potent immune defense mechanisms (Balbi et al., 2013; Ciacci et al., 2010, 2009; Tanguy et al., 2013). However, while many studies explored mussel immune responses towards Gram + and Gram – bacteria including *Vibrios* (Costa et al., 2009; Parisi et al., 2008), strain virulence for *Mytilus* sp. *per se* was never tested. This lack of data is all the more regrettable that, since 2010, abnormal mortality events have touched farmed blue mussels (juveniles and adults) in France, where different bacterial strains were isolated (Guichard et al., 2011).

In this context, we performed 1) for a first time, an evaluation of virulence and a genetic characterization of bacterial strains isolated from *M. edulis*, 2) a construction and validation of two stable GFP-tagged *V. splendidus*-related strains for their use in flow cytometry, and 3) a description of functional activity of mussel hemocytes challenged by virulent and non virulent bacteria or by their extracellular products.

4.1. Pathogenicity of *V. splendidus*-related strains towards the blue mussel

To evaluate virulence of isolates, experimental infection assays were carried out by injecting bacteria into mussels, intramuscularly. Among the tested strains, 10/068 1T1 showed a high and dose dependent degree of virulence (76.6% and 90% mortalities after 24 h and 96 h) whereas 12/056 M24T1 was found innocuous. Phylogenetic analysis using *gyrB*, one of the more polymorphic house-keeping genes used for *V. Splendidus* clade (Le Roux et al., 2004), revealed the affiliation of both virulent and non virulent bacteria 10/068 1T1 and 12/056 M24T1 to the *V. splendidus* and *V. hemicentroti* type strains. Even if more realistic protocols as immersion or cohabitation challenges are needed to confirm the pathogenic potential of this strain, our injection protocol yet allows a marked differentiation of phylogenetically close strains with contrasted pathotypes (76.6% of mortality induced in 24 h vs 0%).

Different strains related to the *Vibrio Splendidus* clade were

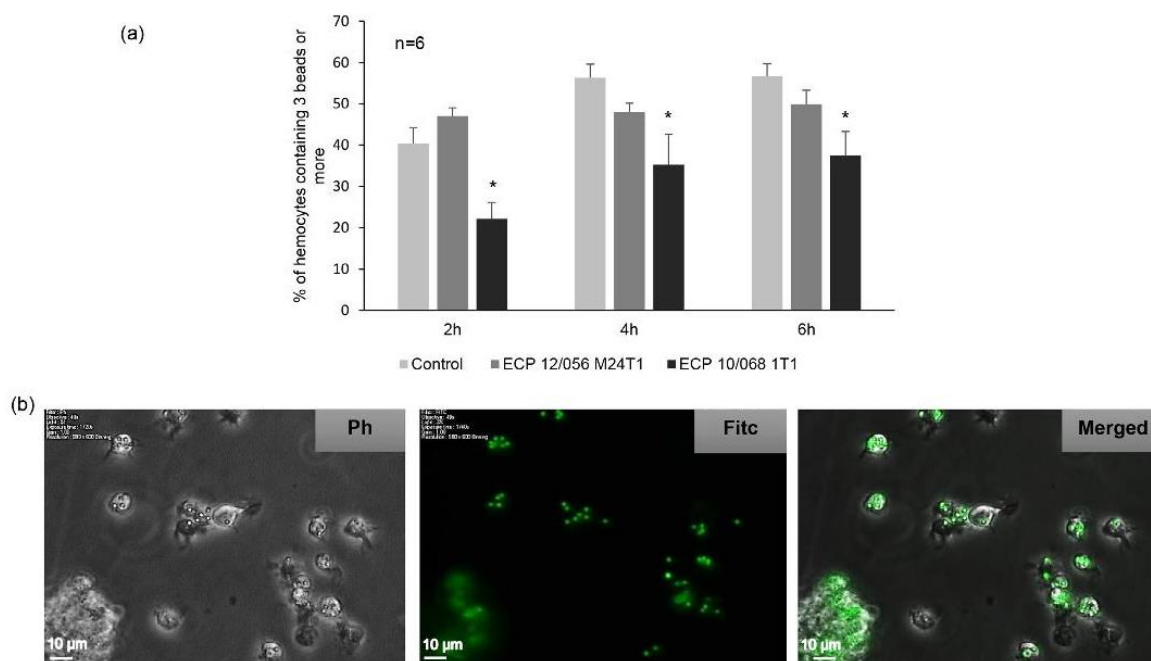


Fig. 6. Effect of bacterial ECPs on bead phagocytosis ability. (a) Flow cytometry analysis of hemocyte incubated *in vitro* with latex beads during 2, 4 and 6 h. The percentage of cells containing 3 beads or more was measured (mean $\pm$ SEM, $n = 6$, $p < 0.05$, Student's *t*-test). (b) Phase contrast (Ph) and fluorescence (Fitc) microscopy observation of hemocytes after 2 h phagocytosis (bar 10 μ m).

implicated in mortalities of various bivalves, including the pacific oyster (Gay et al., 2004; Lacoste et al., 2001; Saulnier et al., 2010), the atlantic scallop (Lambert et al., 1999; Nicolas et al., 1996), the carpet shell clam (Beaz-Hidalgo et al., 2010b) and the greenshell mussel (Kesarodi-Watson et al., 2009). An epidemiological study of *V. splendidus* strains associated with *C. gigas* mortalities demonstrated genetic diversity within this group and suggested its polyphyletic nature (Le Roux et al., 2004). In fact, the *V. splendidus* group includes 16 species, many of them containing virulent and non virulent strains (for instance *Vibrio celticus*, *Vibrio crassostreae*, *Vibrio cyclitrophicus*, *Vibrio tasmaniensis* and *V. splendidus*) (Travers et al., 2015). Concerning *M. edulis*, we conclude that, as in other mollusk species affected by *V. splendidus*-related strains, a virulent pathotype cannot be discriminated through housekeeping gene sequencing since virulent strains appear phylogenetically close to innocuous ones. To define this pathotype, further studies based on a large collection of strains including ecological populations (Hunt et al., 2008) are needed.

A recent study on normal microflora, i.e. microflora of healthy animals, associated with *Mytilus galloprovincialis* reveals a high diversity of strains belonging to 5 major *V. splendidus* groups (Kwan and Bolch, 2015). In accordance with these results, the majority of analyzed strains are close to *V. splendidus*, *V. tasmaniensis*, *V. lentus* or *Vibrio atlanticus*, even if we didn't find *Vibrio toranzoniae*-affiliated genotypes. Efforts to distinguish *V. Splendidus*-related innocuous bacteria that compose natural microflora of mussel from virulent pathotypes are now necessary.

4.2. Construction and validation of GFP-tagged bacteria

To facilitate the study of interactions between *V. splendidus*-

related strains and mussel hemocytes, bacteria were tagged with the Green Fluorescent Protein. Fluorescent 10/068 1T1 and 12/056 M24T1 strains showed a high plasmid stability. They constitute useful tools for flow cytometry and epifluorescence microscopy. However, in some cases, the addition of the marker gene generated changes in bacterial physiology or behavior (Aboubaker et al., 2013; Allison and Sattenstall, 2007; Knodler et al., 2005). To investigate undesired virulence-interfering effects of GFP expression, parental and genetic-engineered bacteria were compared. For both strains, our results indicate that GFP-labeling disturbed neither growth characteristics nor degrees of virulence of bacteria, thus validating the use of 10/068 1T1 and 12/056 M24T1 GFP expressing strains as genuine models for challenging *M. edulis*.

4.3. *Mytilus* hemocyte responses to *Vibrio* strains

Hemocytes form the first defense line of the immune system in bivalves. Similarly to cells of the vertebrate monocyte/macrophage lineage, activated hemocytes achieve pathogen elimination through chemotaxis, phagocytosis and cytotoxic processes, essentially (Liu, 2008).

In an early phase of response to microbial threat, hemocytes migrate toward infected sites. Herein, we explored the influence of *V. splendidus*-related strains on the motility of *M. edulis* hemocytes, by using the nuclei tracking method (Riout et al., 2013). In the absence of stimulation, hemocyte velocity was stable (1 μ m/min). In the presence of the innocuous strain 12/056 M24T1, we observe a progressive speed up of cell motility over 2 h recordings that probably corresponds to a chemoactivation. Chemotactic and chemokinetic responses increase the probability of physical contact between hemocytes and invaders (Schneeweiss and Renwanz,

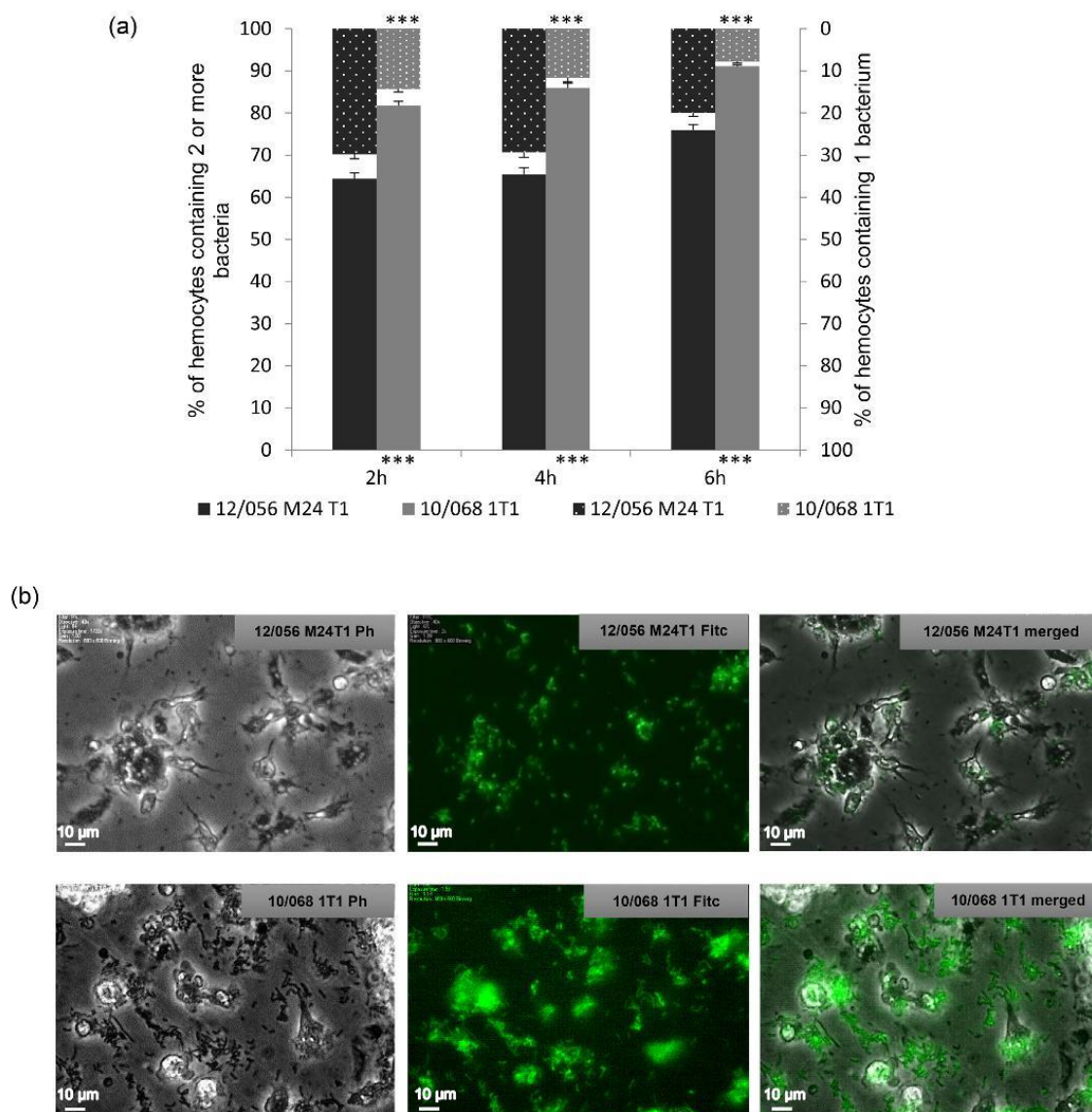


Fig. 7. Hemocyte phagocytic ability towards GFP-tagged bacteria. (a) Comparison between the internalization of virulent and non-virulent bacteria after *in vitro* exposure during 2, 4 and 6 h. Left Y-axis and solid bars refer to the percentage of hemocytes containing 2 or more bacteria. Right Y-axis and dashed bars refer to the percentage of hemocytes containing at least one *Vibrio*. Significant values respectively to non-virulent strain are represented with *** ($p < 0.001$, Student's t-test). Data are means $\pm$ SEM, $n = 6$. (b) Phase contrast (Ph) and fluorescence (Fitc) microscopy observations of hemocyte after internalization of *Vibrio* strains 10/068 1T1 or 12/056 M24T1, bar 10 μ m.

1993), accelerating their detection and recognition. In our experiments however, hemocyte exposure to virulent bacteria 10/068 1T1 triggered more complex responses. The first phase lasting 30 min consists in an immediate acceleration in cell migration (4.7 μ m/min). Thereafter, hemocyte instantaneous velocity progressively decreased to reach control values after 2 h. This deceleration may be a consequence of bacteria virulence capable to alter cell migration. Only few studies evoked the mobility of bivalve hemocytes, their high clumping potential and chemotactic activity towards

pathogens or their extracellular products (Canesi et al., 2002; Pruzzo et al., 2005; Rioult et al., 2013). In blue mussels, Boyden chamber assays revealed that ability of blood cells to generate both chemotactic and chemokinetic reactions depends on the nature of bacteria secreted molecules (Schneeweiss and Renwanz, 1993). Short-term (40 min) chemoactivation have been reported from oyster hemocytes that migrate to accumulate around bacteria (Alvarez et al., 1995).

After migration, vertebrate as invertebrate phagocytes, on

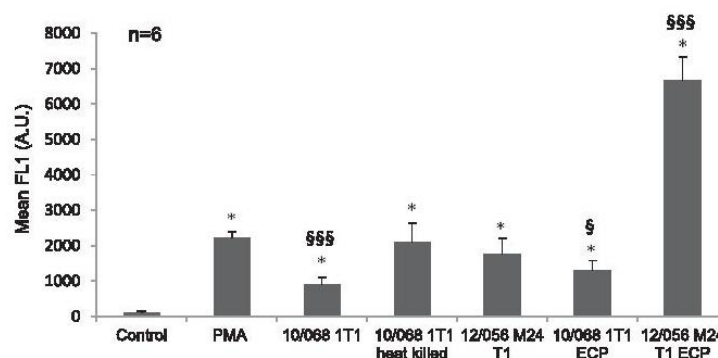


Fig. 8. ROS production in *M. edulis* hemocytes. Hemocytes were pre-exposed 2 h to heat killed or living virulent bacteria at 10^8 cfu ml $^{-1}$, non-virulent bacterial strain at 10^8 cfu ml $^{-1}$, or their extracellular products or PMA 0.2 μ M. Cell fluorescence was quantified by flow cytometry after incubation with CM-H $_2$ DCFDA at 0.2 μ M f.c. Data are means of fluorescence $\pm$ SEM, A.U., n = 6. * indicates significant differences from control (Mann–Whitney rank sum test, $p < 0.05$) and § marks significant differences from PMA (Student's t-test § $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

encounter with foreign objects surfaces, respond by sending out finger-like pseudopods to engulf detected particles (Bayne, 1990). This process requires a major reorganization of cytoskeletal elements in the region of the cell where phagocytosis has been triggered (Russell, 2001) and the resulting filaments must be removed from the base of the forming phagosome to enable its closure (Sarantis and Grinstein, 2012). In our study, we first explored the effect of 10/068 1T1 ECPs on *M. edulis* hemocyte capacity to engulf latex beads.

After 2-h incubations, results indicate a reduction of phagocytic activity to 22%, instead of 40% in control conditions, demonstrating the phagocytosis-inhibition ability of secreted products. A similar significant trend was obtained at 4–6 h after contact while 12/056 M24T1 ECPs had no effect on phagocytosis. The decrease of phagocytosis may be a consequence of a loss of pseudopodia and reduction of adhesion capacity. This is reminiscent of cell detachments and unspreads frequently described for bivalve hemocytes challenged with pathogenic *Vibrio* strains or with their extracellular products. For example, adhesion and phagocytic activity of pacific oyster hemocytes were altered in contact with *V. aestuarianus* 01/32 ECPs or *V. tubiashii* 07/118 T2 ECPs (Labreuche et al., 2006; Mersni-Achour et al., 2014) in a manner that was dependent on ECPs doses (Labreuche et al., 2006). The same hemocyte responses were reported for *M. edulis* and *Mya arenaria* hemocytes challenged with the oyster pathogen *V. splendidus* LGP32 (Araya et al., 2009; Tanguy et al., 2013). Nevertheless, precise molecular mechanisms involved in bacteria alteration of hemocyte phagocytosis are still unclear. Involvement of metalloprotease activities have been suggested since such enzymes are present in ECPs of virulent *Vibrios* and since the metalloenzyme Vsm, secreted by *V. splendidus* LGP32 is toxic to oysters (Binesse et al., 2008). So, it will be interesting to explore the effect of 10/068 1T1 ECPs on adult mussel.

Direct hemocyte phagocytosis of virulent and non virulent GFP-tagged bacteria was also quantitatively investigated. The number of hemocytes strictly containing one engulfed *Vibrio* decreased with time. This number was lower for cells exposed to the virulent strain 10/068 1T1 than for hemocytes incubated with the innocuous strain 12/056 M24T1. In appearance, this result may suggest a more efficient destruction of *Vibrio* 10/068 1T1. Interestingly however, analysis of hemocytes containing 2 or more *Vibrios* results in opposite findings. The percentage hemocytes with 2 or more engulfed bacteria increased time-dependently but was higher for the virulent strain. This latest observation is rather consistent with

a faster internalization of the pathogenic 10/068 1T1 strain in hemocytes, compared to 12/056 M24T1.

In some extent, internalization by host cells may be advantageous for invaders to effectively establish infection and to colonize tissues (Sarantis and Grinstein, 2012). Such mechanisms were observed in some *Vibrio* species, usually considered as extracellular pathogens but having obviously intracellular stages (Duperthuy et al., 2011). This is especially the case of, the coral pathogen *V. shiloi* which invades epithelial cells (Banin et al., 2000) and of *V. splendidus* LGP32, able to attach and invade oyster hemocytes through OmpU porin (Duperthuy et al., 2011). In a good agreement with these studies, it can be proposed that the virulent strain 10/068 1T1 invades mussel hemocytes actively, although its interaction with the cell inner environment remain to be determined.

Among the events taking place during the immune response, the oxidative burst plays an important role in microbe destruction. ROS are lethal weapons used by phagocytes to kill microbial invaders, directly, by causing oxidative damage to biocompounds, or indirectly, by stimulating pathogen elimination (Paiva and Bozza, 2014). In *M. edulis*, we confirmed the capacity of hemocyte to produce oxygen radicals after stimulation by PMA at low doses (García-García et al., 2008). When exposed to non virulent bacteria, mussel blood cells also produced ROS at levels equivalent to the PMA treated group, 12/056 M24T1 ECPs also enhanced oxidative bursts. Increases of ROS production by hemocytes exposed to bacteria or to their extracellular products have been previously reported in the blue mussel (Tanguy et al., 2013) and other bivalves species (Buggé et al., 2007; Lambert et al., 2003).

In the presence of virulent bacteria or of their ECPs, but not after hemocyte exposure to heat killed virulent bacteria, ROS production was significantly inhibited by comparison to PMA-stimulated levels. These data reveal the capacity of the pathogenic *V. splendidus*-related strain 10/068 1T1 to alter cell activation by itself but also through secreted products. As a consequence, it is possible that the pathogenic bacterial strain 10/068 1T1 actually quenches ROS production in *M. edulis* hemocytes as a mean to survive within host cells. In this respect, a wide variety of microbes have developed strategies to promote their survival within hostile cellular environment, in particular by inhibition of ROS-mediated host responses (Spooner and Yilmaz, 2011). For example Densmore et al. (1998) have demonstrated an inhibition of oxidative burst in trout phagocytes, previously stimulated by PMA in the presence of *Renibacterium salmoninarum* ECPs. In invertebrates, *Listonella anguillarum* does not induce any oxidative burst in

Crassostrea virginica hemocytes (Bramble and Anderson, 1997) and quenches ROS production in lobster hemocytes (Moss and Allam, 2006). Likewise, the pathogenic strain *V. harveyi* does not elicit ROS production when added to shrimp hemocytes contrary to a probiotic strain of *V. alginolyticus* which induces cell activation (Muñoz et al., 2000). In addition, *V. splendidus* LGP32 exhibits intracellular survival capabilities and escape from host cellular defenses by avoiding acidic vacuole formation and by limiting ROS production (Duperthuy et al., 2011).

5. Conclusion

In this study, we selected two *V. splendidus*-related strains and constructed GFP-tagged models. The 10/068 1T1 strain was isolated from mortality events reported by professionals and proven as virulent to blue mussel. The 12/056 M24T1 strain was isolated from normal flora and found as innocuous. Functional immune responses of hemocytes challenged by different strains were explored through cell motility, phagocytosis and oxidative burst. Virulent bacteria generated stronger immunocyte responses. Overall, 10/068 1T1 enhanced instantaneously cell migration but adversely affected cell motility after 2 h exposures. These bacteria were also able to quench ROS production and to alter phagocytosis capacity through ECPs secretion. It has been shown that virulent bacteria were rapidly internalized by hemocytes, suggesting more the involvement of a pathogen-controlled invasion strategy than an immune cell-driven phagocytosis process. Taken together, our data support the hypothesis that some bivalve pathogens escape cellular immune response by dysregulation of some hemocyte bactericidal activities. Further investigations are necessary to establish whether hemocytes also constitute carriers for tissues infection.

Acknowledgments

This work received fundings from the State/Region Plan Contract (CPR) allocated through the Research Federation FED 4116 SCALE (Sciences Appliquées à l'Environnement), from the FP7-European project BIVALIFE 'Controlling infectious diseases in oysters and mussels in Europe' (Grant Agreement 266157) and DGAI support through National Reference Laboratory activities for mollusk diseases (Ifremer-La Tremblade). Yosra Ben Cheikh was a recipient for a Ph.D. grant from the Conseil Regional de Haute-Normandie. The authors are indebted to the marine fish farm Aquacaux (Ouveille, France) for valuable technical assistance. Dr. Eric Stabb (Dept. Microbiology, University of Georgia, Athens, USA) is kindly acknowledged for providing us with his excellent *Vibrio* vectors and helper strain. We also thanks LGPMM technical unit, Manon Garrigues and Philippe Haffner for their contribution.

References

Aboubaker, M.H., Sabri  , J., Huet, M., Koken, M., 2013. Establishment of stable GFP-tagged *Vibrio aestuarianus* strains for the analysis of bacterial infection-dynamics in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Vet. Microbiol.* 164, 392–398.

Allison, D.G., Sattenstall, M.A., 2007. The influence of green fluorescent protein incorporation on bacterial physiology: a note of caution. *J. Appl. Microbiol.* 103, 318–324.

Alvarez, M.R., Friedl, F.E., Roman, F.R., 1995. *In vivo* chemoactivation of oyster hemocytes induced by bacterial secretion products. *J. Invertebr. Pathol.* 66, 287–292.

Araya, M.T., Siah, A., Mateo, D.R., Markham, F., McKenna, P., Johnson, G.R., Berthe, F.C.J., 2009. Morphological and molecular effects of *Vibrio splendidus* on hemocytes of softshell clams, *Mya arenaria*. *J. Shellfish Res.* 28, 751–758.

Balbi, T., Fabbri, R., Cortese, K., Smerilli, A., Ciacchi, C., Grande, C., Vezzulli, L., Pruzzo, C., Canesi, L., 2013. Interactions between *Mytilus galloprovincialis* hemocytes and the bivalve pathogens *Vibrio aestuarianus* 01/032 and *Vibrio splendidus* LGP32. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1906–1915.

Banin, E., Israely, T., Kushmaro, A., Loya, Y., Orr, E., Rosenberg, E., 2000. Penetration of the coral-bleaching bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*. *Appl.*

Environ. Microbiol. 66, 3031–3036.

Bayne, C.J., 1990. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates phagocytosis appears to be an ancient line of defense. *BioScience* 40, 723–731.

Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J.L., Figueras, M.J., 2010a. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 34–43.

Beaz-Hidalgo, R., Diéguez, A.L., Cleenwerck, I., Balboa, S., Doce, A., de Vos, P., Romalde, J.L., 2010b. *Vibrio celticus* sp. nov., a new *Vibrio* species belonging to the *Splendidus* clade with pathogenic potential for clams. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 311–315.

Bechemin, C., Soletchnik, P., Polsenaere, P., Le Moine, O., Pernet, F., Protat, M., Fuhrmann, M., Quere, C., Goulitquer, S., Corporeau, C., Renault, T., Lapegue, S., Travers, M.-A., Morga, B., Garriques, M., Garcia, C., Haffner, P., Dubreuil, C., Faury, N., Baillon, L., Baud, J.-P., 2014. Surmortalités de la moule bleue *Mytilus edulis* dans les Pertuis Charentais (mars 2014).

Binesse, J., Delsert, C., Saulnier, D., Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M., Munier-Lehmann, H., Mazel, D., Le Roux, F., 2008. Metalloprotease vsm is the major determinant of toxicity for extracellular products of *Vibrio splendidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7108–7117.

Bramble, L., Anderson, R.S., 1997. Modulation of *Crassostrea virginica* hemocyte reactive oxygen species production by *Listonella anguillarum*. *Dev. Comp. Immunol.* 21, 337–348.

Bugg  , D.M., Hégaret, H., Wikfors, G.H., Allam, B., 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 188–196.

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Tech.* 57, 469–476.

Casadevall, A., Pirofski, L.-A., 2009. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. *J. Water Health* 7 (Suppl. 1), S2–S18.

Ciacchi, C., Citterio, B., Betti, M., Canonico, B., Roch, P., Canesi, L., 2009. Functional differential immune responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenge. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 153, 365–371.

Ciacchi, C., Betti, M., Canonico, B., Citterio, B., Roch, P., Canesi, L., 2010. Specificity of anti-*Vibrio* immune response through p38 MAPK and PKC activation in the hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 49–55.

Costa, M.M., Prado-Alvarez, M., Gestal, C., Li, H., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A., 2009. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 515–523.

Densmore, C.L., Smith, S.A., Holladay, S.D., 1998. *In vitro* effects of the extracellular protein of *Renibacterium salmoninarum* on phagocyte function in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 62, 349–357.

Domaghy, L., Lambert, C., Choi, K.-S., Soudant, P., 2009. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects. *Aquaculture* 297, 10–24.

Dunn, A.K., Millikan, D.S., Adin, D.M., Bose, J.L., Stabb, E.V., 2006. New rfp- and pES213-derived tools for analyzing symbiotic *Vibrio fischeri* reveal patterns of infection and lux expression *in situ*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 802–810.

Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzón, E., Caro, A., Rosa, R.D., Le Roux, F., Lautrédou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., de Lorig  r, J., Kieffer-Jacquod, S., Bachère, E., Destoumieux-Garzón, D., 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2993–2998.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.

García-García, E., Prado-Alvarez, M., Novoa, B., Figueras, A., Rosales, C., 2008. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 637–653.

Gay, M., Renault, T., Pons, A.-M., Le Roux, F., 2004. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis. Aquat. Org.* 62, 65–74.

Gestal, C., Roch, P., Renault, T., Pallavicini, A., Paillard, C., Novoa, B., Oubella, R., Venier, P., Figueras, A., 2008. Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics. *Rev. Fish. Sci.* 16, 133–156.

Gosling, E., 2015. Marine Bivalve Molluscs. John Wiley & Sons.

Guichard, B., Francois, C., Joly, J.-P., Garcia, C., Saulnier, D., Pepin, J.-F., Arzul, I., Omnes, E., Tourbiez, D., Faury, N., Haffner, P., Chollet, B., Robert, M., Renault, T., Raufflet, F., Le Gagneur, E., Ropert, M., Mouillard, G., Gerla, D., Annezo, J.-P., Le Gal, D., Langlade, A., Bedier, E., Br  r  tte, S., Chabirand, J.-M., Grizon, J., Robert, S., Courtois, O., Rumebe, M., Cantin, C., 2011. Bilan 2010 du réseau Repamo - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins.

Hunt, D.E., David, L.A., Gevers, D., Preheim, S.P., Alm, E.J., Polz, M.F., 2008. Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. *Science* 320, 1081–1085.

Kesarcondi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L., 2009. Two pathogens of Greenshell mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius*-like isolate. *J. Fish. Dis.* 32, 499–507.

Knodler, L.A., Bestor, A., Ma, C., Hansen-Wester, I., Hensel, M., Vallance, B.A., Steele-Mortimer, O., 2005. Cloning vectors and fluorescent proteins can significantly inhibit *Salmonella enterica* virulence in both epithelial cells and macrophages: implications for bacterial pathogenesis studies. *Infect. Immun.* 73, 7027–7031.

Kwan, T.N., Bolch, C.J.S., 2015. Genetic diversity of culturable *Vibrio* in an Australian blue mussel *Mytilus galloprovincialis* hatchery. *Dis. Aquat. Org.* 116, 37–46.

- Labreuche, Y., Soudant, P., Gonçalves, M., Lambert, C., Nicolas, J.-L., 2006. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 367–379.
- Labreuche, Y., Le Roux, F., Henry, J., Zatylny, C., Huvet, A., Lambert, C., Soudant, P., Mazel, D., Nicolas, J.-L., 2010. *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 753–758.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cuff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M., Poulet, S.A., 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis. Aquat. Org.* 46, 139–145.
- Lambert, C., Nicolas, J.L., Cilia, V., 1999. *Vibrio splendidus*-related strain isolated from brown deposit in scallop (*pecten maximus*) cultured in Brittany (France). *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 102.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic *Vibrios*. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 225–240.
- Le Foll, F., Rioult, D., Boussa, S., Pasquier, J., Dagher, Z., Leboulenger, F., 2010. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 372–386.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Nicolas, J.L., Gouy, M., Berthe, F., 2004. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Dis. Aquat. Org.* 58, 143–150.
- Liu, D.-W., 2008. Opioid peptides and innate immune response in mollusc. *Protein Pept. Lett.* 15, 683–686.
- Mersni-Achour, R., Imbert-Auvray, N., Huet, V., Ben Cheikh, Y., Faury, N., Doghri, I., Rouatbi, S., Bordenave, S., Travers, M.-A., Saulnier, D., Fruitier-Arnaudin, I., 2014. First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: II. Characterization of properties of the proteolytic fraction of extracellular products. *J. Invertebr. Pathol.* 123, 49–59.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Roch, P., 2000. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* 486, 185–190.
- Moss, B., Allam, B., 2006. Fluorometric measurement of oxidative burst in lobster hemocytes and inhibiting effect of pathogenic bacteria and hypoxia. *J. Shellfish Res.* 25, 1051–1057.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W.P.W., Mialhe, E., Bachère, E., 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191, 89–107.
- Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R., Ansquer, D., 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Org.* 27, 67–76.
- Paiva, C.N., Bozza, M.T., 2014. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxid. Redox Signal* 20, 1000–1037.
- Parisi, M.-G., Li, H., Jouvett, L.B.P., Dyrnyda, E.A., Parrinello, N., Cammarata, M., Roch, P., 2008. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 834–840.
- Pruzzo, C., Gallo, G., Canesi, L., 2005. Persistence of *Vibrios* in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environ. Microbiol.* 7, 761–772.
- Rioult, D., Lebel, J.-M., Le Foll, F., 2013. Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes *in vitro*. *Cytotechnology* 65, 749–758.
- Rioult, D., Pasquier, J., Boulange-Lecomte, C., Poret, A., Abbas, I., Marin, M., Minier, C., Le Foll, F., 2014. The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. *Aquat. Toxicol.* 153, 98–109.
- Russell, D.G., 2001. Phagocytosis. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Sarantis, H., Grinstein, S., 2012. Subversion of phagocytosis for pathogen survival. *Cell Host Microbe* 12, 419–431.
- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. *J. Microbiol. Methods* 77, 191–197.
- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M., García, C., 2010. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microb. Ecol.* 59, 787–798.
- Schneeweiss, H., Renwanz, L., 1993. Analysis of the attraction of haemocytes from *Mytilus edulis* by molecules of bacterial origin. *Dev. Comp. Immunol.* 17, 377–387.
- Spooner, R., Yilmaz, Ö., 2011. The role of Reactive-Oxygen-Species in microbial persistence and inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 334–352.
- Stabb, E.V., Ruby, E.G., 2002. RP4-based plasmids for conjugation between *Escherichia coli* and members of the *Vibrionaceae*. *Method Enzymol.* 358, 413–426.
- Steinhaus, Edward Arthur, Martignoni, Mauro E., 1970. An Abridged Glossary of Terms Used in Invertebrate Pathology.
- Tanguy, M., McKenna, P., Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Danger, J.-M., Siah, A., 2013. Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 419–429.
- Thompson, F.L., Gevers, D., Thompson, C.C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C.B., Swings, J., 2005. Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5107–5115.
- Travers, M.-A., Boettcher Miller, K., Roque, A., Friedman, C.S., 2015. Bacterial diseases in marine bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 11–31.
- Watermann, B.T., Herlyn, M., Daehne, B., Bergmann, S., Meemken, M., Kolodzey, H., 2008. Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. *J. Fish. Dis.* 31, 621–630.

Article 2: Dynamiques d'infection de *V. splendidus* pathogène pour *M. edulis* : interactions *in vivo* et *in vitro* avec les hémocytes

En préparation

L'article 2 décrit 1) le suivi des dynamiques d'infection du pathogène *V. splendidus* 10/068 1T1 via un modèle expérimental et 2) ses interactions *in vivo* et *in vitro* avec les hémocytes.

L'étude des interactions entre *V. splendidus* 10/068 1T1 et les hémocytes *in vitro* a confirmé l'effet toxique du vibron qui a causé une baisse significative de l'adhésion cellulaire et de la viabilité. En outre, le pathogène a inhibé la maturation du phagosome. La cohabitation des animaux porteurs de la bactérie virulente avec des moules saines a induit un taux de mortalité de 16.6% et 45% après 3 jours et 6 jours respectivement. Les bactéries GFP ont été détectées dans l'eau de mer ainsi que dans les tissus et les hémocytes. Par ailleurs, la quantité de vibrons dans l'eau de mer a diminué suggérant leur transmission horizontale à l'hôte via l'eau. Les analyses immunohistochimiques ont révélé principalement la colonisation et l'altération des branchies. De plus, la viabilité des hémocytes circulants ainsi que leur concentration a été affectée.

En conclusion, l'ensemble des résultats indique que *V. splendidus* 10/068 1T1 infecte *Mytilus edulis* via le dérèglement des fonctions hémocytaires et la colonisation des branchies.

Infection dynamics of a *V. splendidus* strain pathogenic to *Mytilus edulis*: in vitro and in vivo interactions with hemocytes

Yosra Ben Cheikh^a, Marie-Agnès Travers^b and Frank Le Foll^a

Authors affiliation

^a University of Le Havre Normandy, Environmental Stress and Aquatic Biomonitoring, UMR-I 02 SEBIO, 25 rue Philippe Lebon, F-76063 Le Havre, France

^b Ifremer, SG2M-LGPMM, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France.

Abstract

The pathogenic *V. splendidus* 10/068 1T1 have previously been reported for its virulence to the blue mussel and for its capacity to alter immune responses. In this study, we expanded the knowledge on hemocyte pathogen interactions by using *in vitro* and *in vivo* assays. *V. splendidus* 10/068 1T1 severely inhibited cell adhesion and acidic vacuole formation unlike the innocuous phylogenetically related *V. splendidus* 12/056 M24T1 which had no effect on these cell functions. Furthermore, this virulent bacteria decreased hemocyte viability (59% of viability after 24h). We also explored infection dynamics of *V. splendidus* 10/068 1T1 a water tank cohabitation model with septic mussels. Experimental infection was successfully reproduced (16.6% and 45% mortalities in 3 days and 6 days). The amount of GFP *Vibrio* in seawater decreased during the experiment suggesting potential horizontal transfer from diseased animals to healthy ones. At the same time intervals, bacteria were also detected in hemocytes and pallial organs and the concentration of circulating hemocytes as well as their viability were affected. Taken together, our results indicate that the pathogen *V. splendidus* 10/068 1T1 colonize its host by bypassing external defense barriers and through an impairment of hemocyte defense activities.

Keywords: innate immunity, molluscs, *Vibrio*, infection.

1. Introduction

Heterotrophic bacteria from the genus *Vibrio* are highly abundant in aquatic environments mostly in seawater (Thompson et al., 2004). These ubiquitous microorganisms persist in a variety of geographic areas in interaction with eukaryotic marine hosts, including zooplankton, sponges, corals and molluscs (Thompson et al., 2004). *Vibrio* sp. show a remarkable biodiversity. Until now, more than 110 species are recognized in this genus, encompassing symbionts and pathogens (Hasan et al., 2015; Travers et al., 2015).

Many species are known to be pathogenic to terrestrial or marine vertebrates and invertebrates. In particular, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* are known to cause severe illness in humans (Feldhusen, 2000; Powell, 1999). Furthermore, some *Vibrio* sp. bacteria have been associated with serious diseases in numerous aquatic organisms including fish (Colwell and Grimes, 1984), corals (Ben-Haim and Rosenberg, 2002), shrimp (Goarant et al., 2006) and shellfish (Paillard et al., 2004). Because of the high economic loss generated by infectious diseases in the aquaculture sector, many studies are dedicated to bacterial diseases particularly in cultured bivalves (see reviews Beaz-Hidalgo et al., 2010a; Paillard et al., 2004; Travers et al., 2015). Among the etiological agents, the *Splendidus* clade has been repeatedly described in relation to mortality events. This polyphyletic group includes 16 species with contrasted pathotypes (Ben Cheikh et al., 2016; Kwan and Bolch, 2015). Different strains were implicated in mortalities of various bivalves, e.g. the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Gay et al., 2004; Lacoste et al., 2001; Saulnier et al., 2010), the Atlantic scallop *Pecten maximus* (Lambert et al., 1999; Nicolas et al., 1996), the carpet shell clam *Ruditapes philippinarum* (Beaz-Hidalgo et al., 2010b), the greenshell mussel *Perna canaliculus* (Kesarcodi-Watson et al., 2009) and recently the blue mussel *Mytilus edulis* (Ben Cheikh et al., 2016).

While infection mechanisms are well studied in human invaders, little is known regarding invertebrate pathogens. A few results have been gathered for particular species, especially on host-pathogen interactions (Araya et al., 2009; Balbi et al., 2013; Ben Cheikh et al., 2016; Duperthuy et al., 2011). However, invasion processes remain poorly documented. Understanding infection dynamics is an essential step for developing disease management strategies (Restif and Graham, 2015). Considering that, there is a need for robust and standardized experimental models of *Vibrio*-bivalve interactions.

From mortality events, we have recently isolated a *Vibrio* strain virulent to the blue mussel. *V. splendidus* 10/068 1T1 has been shown to alter hemocyte phagocytosis capacities, a key parameter of the immune defense system in mussels. Furthermore, a stable GFP-tagged *Vibrio* strain was constructed to facilitate the study of interactions between the microbe and immune cells (Ben Cheikh et al., 2016). Fluorescent proteins (FP)-tagged microorganisms constitute a useful tool to monitor colonization processes. They have been used to elucidate early invasion events in squids (Nyholm et al., 2000; Nyholm and McFall-Ngai, 2003) and in filter feeding oysters (Cabello et al., 2005).

In this context, we investigated infection dynamics of *V. splendidus* 10/0681 T1 in *Mytilus edulis*. This study describes (i) the development of an experimental infection model by water tank cohabitation with septic mussels, (ii) the localization of GFP bacteria in tissues of diseased animals and (iii) *in vitro/in vivo* interactions between the pathogenic *Vibrio* strain and *Mytilus edulis* hemocytes.

2. Material and methods

2.1. Mussel collection

Adult mussels, *M. edulis* with shell length ranging from 4 to 5 cm, were collected on the intertidal rocky shore of Yport (0°18'52"E:49°44'30"N, France) between December 2015 and March 2016, immediately transported to the laboratory and placed in a temperature-controlled (10°C) aerated Biotop Nano Cube 60 seawater tank (Sera, Heinsberg, Germany), equipped with mechanical and activated biological filtering. The animals were fed with algae (*Isochrysis galbana*) and maintained in these conditions for at least one week before use.

2.2. Bacterial strains and culture conditions

Two parental and GFP-tagged *V. splendidus*-related strains were used in this study: a virulent *V. splendidus* 10/068 1T1 isolated from mussel mortality events reported by professional (French national surveillance network REPAMO) in 2010 and an innocuous *V. splendidus* 12/056 M24T1 isolated from mussel microflora in absence of mortality, in the context of Bivalife European project in 2012 (Ben Cheikh et al., 2016). Bacteria were routinely cultivated overnight in LBS [Luria Bertani complemented with salt, NaCl 20 g.L⁻¹] at 22°C. Stock cultures were stored at -80°C in LBS with glycerol 15% (v/v) supplemented with kanamycin 100 µg.L⁻¹ for GFP-tagged strains.

2.3. *In vitro* hemocyte challenge

2.3.1. Hemolymph collection

Hemolymph was withdrawn from the posterior adductor muscle sinus, by gentle aspiration with a 1 mL syringe equipped with a 22G needle. Quality of samples was systematically checked by microscopic observation before using in bioassays.

2.3.2. Hemocyte adhesion

Cells were incubated with bacteria at a ratio of 10 bacteria/hemocyte in sterile physiological water (NaCl 9 g.L⁻¹), in a 24-well tissue-culture plates (Greiner). After 2, 4 and 6 hours at 15°C, the number of non-adherent cells in the supernatant was counted by flow cytometer.

2.3.3. Acidic vacuole formation

Crude hemolymph was placed into individual wells of 24-well tissue-culture plates (Greiner) for cytometry or in 35 mm μ -Dish (Ibidi) for microscopy. Cells were exposed to *Vibrio* strains at 10:1 ratio (bacteria: hemocytes) for 2 hours at 15°C.

Lysotracker (LysoTracker® Green DND-26, life technologies) at 2 μ M was added and cells were incubated for 30 minutes at 15°C in the dark. Hemocyte fluorescence was quantified by flow cytometry. For microscopy imaging, cells were washed by the marine physiological saline solution [MPSS (470 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, 48.7 mM MgSO₄), pH 7.8, 0.2 μ m filtered]. Hemocyte nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (5 μ M, 15 min) and imaged by epifluorescence microscopy.

2.3.4. Hemocyte viability

Hemocytes were exposed to bacteria (10/068 1T1 and 12/056 M24T1) at 10⁸ CFU.mL⁻¹ for different time periods at 15°C. At each time point, propidium iodide was added (20 μ M) and cell viability was measured by flow cytometry.

2.4. *In vivo* challenge

2.4.1. Infection by water tank cohabitation with septic mussels

Bacteria were prepared at OD_{600nm} of 1 as described in [Ben Cheikh et al. \(2016\)](#). Animals were anesthetized for 2–3 h at 16°C in a magnesium chloride solution (50 g.L⁻¹, 1/4: v/v seawater/freshwater) under constant aeration. Subsequently, a volume of 100 μ L of bacterial suspension, or filtered sterile seawater (FSSW) for the negative control, was injected into the

posterior adductor muscle. After injection, the animals were transferred to tanks filled with 2L of UV-treated and filtered seawater supplemented with 50 mL of phytoplankton (*Isochrysis galbana*). After 24 hours, moribund animals were sacrificed by severing their adductor muscle and used for cohabitation assay. A group of 10 healthy mussels was placed in new seawater tank in cohabitation with 3 injected animals (with *Vibrio* strain or with FSWW). After 72 hours of cohabitation, injected mussels were removed. During the experiment, animals were maintained under static conditions at 16°C with aeration. Mortality was monitored each day over a six days period. Animals were considered to be dead when the valves did not close following stimulation. Newly dead mussels were removed from the tanks.

2.4.2. Bacteria counting in seawater

Seawater was sampled from cohabitation tanks each day during the experiment period. 100 µL of samples serially diluted in sterile physiological water was plated on LBS agar supplemented with kanamycin 100 µg.L⁻¹. After 48h at 22°C, colonies were counted. The presence of GFP colonies was verified under a fluorescence stereo microscope (Leica microsystems).

2.4.3. Hemocyte cellular parameters analysis

Hemolymph was sampled from exposed mussel and mixed with cold Alsever's solution (300 mM NaCl, 100 mM Glucose, 30 mM sodium Citrate, 26 mM citric acid, 10 mM EDTA, pH 5.4) for cytometry analysis.

Variation in hemocyte count and the percentage of cells containing GFP-tagged bacteria was determined. Cell viability was investigated by adding propidium iodide (20 µM).

2.4.4. Histological and immunohistochemical analyses

During cohabitation infection, mussels were sampled at different time periods and removed from their shell. Tissues were fixed in Davidson's solution (20% formaldehyde 36%, 30% FSSW, 10% glycerol, 30% ethanol 95% and 10% acetic acid) for 48h, dehydrated in a graded series of ethanol, and embedded in paraffin. Consecutive 3-5 µm thick sections were adhered to Superfrost (HE) or Superfrost Plus (IHC) microscope slides.

For tissue examination, sections were stained by classical Hematoxylin-Eosin protocol. Presence of listed pathogens (*Bonamia* sp., *Marteilia* sp., *Perkinsus* sp. and *Mikrocytos* sp.) was examined as well as trematods, copepods, *Mytilicola*, *Ciliophora*, ciliates and gregarines. For lesions, we noticed the presence of necrosis, bacterial "foyer", hemocytes infiltration and granulomes into the different tissues: gills, gonads, digestive glands, mantle, muscle, kidney

and digestive tube. The lesions in each organ were coded as follows: 0 (absence of lesion); 1 (low), 2 (average), 3 (high).

For IHC, a polyclonal antibody raised in rabbit against recombinant full length GFP protein was used (Ab290, Abcam). The specificity of this antiserum has been previously tested and optimized. Immuno-labellings were performed with a Benchmark automate (Ventana-Roche) by HistaIm (Montpellier). Sections were incubated for 32 min with primary antibody (1:5000) and revealed with Ultraview Red Alkaline Phosphatase kit (Roche Diagnostics). Slides were finally numerized with a Nanozoomer x20 (Hamamatsu). Labeling of bacterial-like cells was coded as follows: 0 (absence of labelling); 1 (low), 2 (average), 3 (high).

2.5. Statistical analyses

Statistical analysis was performed by using SigmaPlot 12 (Systat Software Inc., Chicago, IL). Replicates were averaged and the values were tested for normality (Shapiro-Wilk) and paired comparisons were performed by Student's t-tests or by Mann-Whitney rank sum tests in case of unequal variance. Statistical significance was accepted for * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$.

3. Results

3.1. Hemocyte adhesion

The effect of *V. splendidus*-related strains on hemocyte adhesion was evaluated for different time periods (**Figure 1**). The virulent *V. splendidus* 10/068 1T1 significantly affected cell attachment to culture dish for periods of incubation as short as 2 hours. Moreover, the number of detached cells increased for 6-h incubations. In contrast, when exposed to the innocuous *Vibrio* strain 12/056 M24T1, non-adherent cells increased slightly after 2-h exposures and then decreased.

3.2. Acidic vacuole formation

The capacity of *M. edulis* hemocyte to generate phagolysosome after exposure to virulent and avirulent bacteria *in vitro* was investigated by flow cytometry and epifluorescence microscopy (**Figure 2**). The lysotracker signal, indicative of acidic vacuole formation, was significantly higher in hemocytes challenged with the strain 12/056 M24T1 than in cells co-cultured with the strain 10/068 1T1 ($p < 0.001$, **Figure 2a**). Moreover, in the case of exposure to 12/056 M24T1, numerous phagolysosomic compartments surrounding the nucleus can be found

(**Figure 2b**). Microscopic observation also confirmed the absence of large acidic compartments in cells challenged with the virulent strain.

3.3. Hemocyte viability

The effect of *V. splendidus*-related strains on hemocyte viability was evaluated at different time intervals. Cell viability was stable for the first 6 hours for both strains with values corresponding 92% of viable cells (**Figure 3**). Then, hemocyte viability slightly decreased until 24h post exposure to the innocuous strain 12/056 M24T1, but was never lowered under 80 %.

In contrast, in the same time intervals, the viability of cells incubated with the strain 10/068 1T1 was significantly affected, reaching a percentage of viable cells of only 59% for 24h exposures to the virulent strain.

3.4. *Vibrio* infection by cohabitation challenge

The experimental infection of mussels with the pathogenic *V. splendidus* 10/068 1T1 was assessed by water tank cohabitation assays (**Figure 4**). First mortalities appeared after 3 days (16.6%) and increased progressively to reach almost 45% at the 6th day. No mortality was observed in control tanks.

3.5. Seawater bacteria count during infection

Bacteria density in cohabitation tank seawater was monitored during infection (**Figure 5**). After 48h of cohabitation, initial *Vibrio* density was equal to 3.10^6 CFU/mL, then decreased progressively to 2.10^3 CFU/mL after 5 days.

3.6. Cellular parameters analysis: *in vivo* assays

Different hemocyte parameters were investigated during cohabitation assays with septic mussels infected by the strain 10/068 1T1 (**Figure 6**). In hemolymph sampled from the adductor muscle, hemocyte concentration increased significantly 48 h after cohabitation initiation and then decreased until the end of the exposure to reach control values (**Figure 6a**). Interestingly, GFP bacteria were detected in hemocytes. The percentage of cells containing GFP-tagged *Vibrio* was also higher at the beginning of the exposure and then decreased progressively (**Figure 6b**). Furthermore, hemocyte viability slightly decreased compared to the control but remained almost stable during *Vibrio* infection (80% of viable cells at day 2 and 74% at day 5, **Figure 6c**).

3.7. Tissue infection by bacteria

First of all, no listed parasites were found in the 40 mussels (19 females and 21 males). Some trematods metacercaria (36 individuals positive /40), copepods (3/40), *Ciliophora* (5/40), ciliates (3/40) or gregarines (9/40) were noticed (**supplementary figure 1, Table 1**).

However, the most noticeable microorganism present on hematoxylin-eosin stained slides corresponds to bacteria. Seventeen of the 40 analyzed individuals present bacterial cells into gills (8 low amount, 6 moderate and 3 high). Bacteria were also noticed in digestive tissues (10 individuals – 6 low and 4 moderate) and mantle (9 individuals – 3 low and 6 moderate) (**supplementary figure 1D, Table 1**).

GFP-*Vibrio* were detected mainly in gills (7 animals /28 live animals; 6 animals / 7 moribund animals), either in the pallial cavity in aggregates, attached to apical cilia or between *ordinary gill filaments* (**Figure 7A, C**). Some labeling were also noticed in esophagi or stomach (4 animals /28 live animals) (**Figure 7D**).

The main lesions observed correspond to necrosis of epithelia (gills and digestive tissues, respectively 30 and 10/40 animals) and hemocyte infiltrations (17/40), as well as granulomas in the mantle (17/40) (**Figure 7B, supplementary figure 1C-E, Table 1**). Moribund animals present general necrosis even if some organs remain in good aspect (muscle, gonad, kidney and mantle) and bacteria in large amounts (**Figure 7B, Table 1**).

4. Discussion

In a previous study, we have reported the virulence of *V. splendidus* 10/068 1T1 to the blue mussel and its capacity to alter some functional immune response ([Ben Cheikh et al., 2016](#)). Herein, we attempt to expand the knowledge on hemocyte-pathogen interactions by exploring infection dynamics via an experimental model of infection by water tank cohabitation with septic mussels.

4.1. *In vitro* hemocyte pathogen interactions

Among immune responses, cell attachment to the invader play an important role as an initiation step of phagocytosis. In our experiments, *V. splendidus* 10/068 1T1 severely altered hemocyte adhesion to the culture substratum. After 2 hours of incubation in presence of the virulent *Vibrio*, the number of non-adherent cells was higher than in non-treated culture or cells co-incubated with the innocuous bacteria. This effect increased after 6h. Similar observations were made for other *Vibrio* species. For example, *V. tasmaniensis* LGP32 decreased hemocyte

adhesion capacity in *Mytilus edulis* (Tanguy et al., 2013), *Mytilus galloprovincialis* (Ciacci et al., 2010) and *Mya arenaria* (Mateo et al., 2009). The same response was reported for *Crassostrea gigas* hemocytes challenged with *V. aestuarianus* 01/32 (Labreuche et al., 2006a) and cells of *Ruditapes philippinarum* in contact with *V. tapetis* (Choquet et al., 2003). Despite these results, specific mechanism by which the pathogen induce cell linkage impairment remain poorly understood. Some studies suggested the involvement of bacteria secreted proteases responsible for cytoskeleton disruption and consequently pseudopodia loss. In the Pacific oyster, hemocyte treatment with extracellular products (ECPs) of *V. aestuarianus* 01/32 or *V. tubiashii* 07/118 T2 inhibited cell attachment (Labreuche et al., 2006b; Mersni-Achour et al., 2014). Furthermore, authors demonstrated the hydrolytic action of extracellular effectors capable to degrade muscle collagen and also bovine actin and fibronectin proteins (Mersni-Achour et al., 2014). In our case, we already shown the inhibitory effect of *V. splendidus* 10/068 1T1 ECPs on *M. edulis* hemocyte phagocytosis (Ben Cheikh et al., 2016). Thus, we may think that bacteria impaired hemocyte adhesion also through its secreted products.

Upon entrance to cell, the fate of bacteria depends on phagosome biogenesis and maturation. Intracellular trafficking and killing of engulfed microorganisms is a highly choreographed process driven by subsequent fusion and fission events during which the maturing phagosome acquires the characteristics of degradative acidic lysosomes (Russell, 2001; Weiss and Schaible, 2015). In our study, *V. splendidus* 10/068 1T1 inhibited acidic vacuole formation in mussel hemocytes while the innocuous phylogenetically related *V. splendidus* 12/056 M24T1 had no negative effect. Such mechanism has been described for intracellular pathogens as strategy to survive and maintain infection in the cell. This is the case of *Legionella pneumophila*, the causative agent of Legionnaire's pneumonia, known for its ability to manipulate host cell vesicular trafficking pathways and to inhibit phagosome-lysosome fusion (Horwitz, 1983; Isberg et al., 2009). In the same way, *Mycobacterium* sp. reside inside vacuoles and arrest the fusion with late endosomal/lysosomal organelles (Armstrong and Hart, 1971; Russell et al., 2002). For *Vibrio* species, few reports have shown their capacity to adopt intracellular stages (Rosenberg and Falkovitz, 2004; Santos and Orth, 2014; Zhang et al., 2012). To our knowledge, only *V. tasmaniensis* LGP32 has been described as a facultative intracellular pathogen of the Pacific oyster, able to modulate phagosome maturation as well as oxidative response (Duperthuy et al., 2011). More recently, Vanhove et al. (2016) showed the intracellular surviving of this strain driving to hemocyte cytolysis (more than 25% of cell lysis after 17h incubation). In accordance with these findings, it seems that *V. splendidus* 10/068 1T1 displays

a similar infection strategy to *V. tasmaniensis* LGP32. Besides altering phagosome maturation and ROS production (Ben Cheikh et al., 2016), this *Mytilus edulis* pathogen affected hemocyte viability and induced almost 39% of dead cells after 18h. The latter point proves the cytotoxicity of the bacteria and suggests its surviving into the cells.

4.1. *In vivo* infection dynamics

Understanding pathogenesis processes requires an animal model of infection (Le Roux et al., 2016). In our previous study, we have demonstrated the virulence of *V. splendidus* 10/068 1T1 towards the blue mussel by injection (Ben Cheikh et al., 2016). In spite its efficacy and reproducibility, this method don't reflect the realistic way of host-bacteria interaction. Herein, we successfully reproduced experimental infection by cohabitation assays. In this conditions, first mortalities appeared after 3 days and increased progressively suggesting a necessity of time for bacteria transfer from diseased animals and their incubation in healthy mussels. At the same period intervals, the amount of *Vibrio* released in the seawater decreased (3.10^6 CFU/mL at the 2nd day to 2.10^3 CFU/mL at the 6th day) suggesting bacteria transmission via the water. Limited works experimented non-invasive methods for the study of bivalve disease. For example, vibriosis was induced in the Pacific oyster by cohabitation (Azéma et al., 2015; De Decker and Saulnier, 2011) or by balneation assays (De Decker et al., 2011). In our case, the bathing procedure didn't cause any mortality (data not shown) unlike cohabitation experiments. This negative result indicates the complexity of the infection process and suggests that bacteria requires a priming infectious niche to initiate secondary virulence mechanisms. In order to investigate host pathogen interactions, hemocyte parameters were analyzed during cohabitation experiments. The number of circulating cells was affected by a transient increase within the 2 first days post challenge and then a diminution of cells in suspension in hemolymph. Such fluctuations have been described in diverse bivalve species like *M. edulis* (Renwrantz et al., 2013), *M. galloprovincialis* (Ciacchi et al., 2009) and *R. philippinarum* (Allam et al., 2006) in response to physical stresses or pathogen threats. Some authors justified this variation in hemocyte count by cell proliferation (Renwrantz et al., 2013). Nevertheless, the most recurrent explanation to the cell number rise is the mobilization of hemocytes from tissues into the hemolymph after a pathogen invasion (Allam et al., 2006; Labreuche et al., 2006a). Thus, in the present work, hemocyte number variations may result from the migration of cells into hemolymph or inversely their infiltration in other infected sites. However, considering that first mortalities appeared after 3 days, the decrease of cell concentration at this period can be also accounted for bacteria virulence consequence. Indeed, cell viability was significantly altered

confirming the results of *in vitro* trial and the toxicity of bacteria. Furthermore, *V. splendidus* 10/068 1T1 was detected in hemocytes and bacteria amount declined progressively. The latter result is probably due to cell lysis and bacteria release.

GFP *Vibrio* was also detected in diverse organs principally in mantle, gills and digestive gland. Affinity of bacteria to these tissues may be explained by their richness on nutriment probably advantageous to *Vibrio* growth and infection. Moreover, infectious diseases in bivalves are initiated at mucosal interfaces (Allam and Pales Espinosa, 2016). Thus, upon the cross of mucosal epithelia barrier, bacteria is faced to pallial organs which can constitute good infection initiation sites. Nevertheless, to establish a chronology, the entry route of bacteria has to be identified. Few studies explored portal access of pathogens in bivalves. For example, the organic matrix of the shell has been described as a putative entryway of the pathogenic *V. tapetis* in the clam *R. philippinarum*, (Allam et al., 2002; Paillard and Maes, 1995). More recently, a study suggested the involvement of hemocytes in microbe transport since their ability to migrate across mucosal epithelia and to translocate within hours from pallial surfaces to underlying tissues and the circulatory system (Allam and Pales Espinosa, 2016). This hypothesis may be plausible in our study considering the cytotoxicity of *V. splendidus* 10/068 1T1 to hemocytes. Further investigations at the first hours of infection are needed to elucidate whether hemocytes are the first or the last target of pathogens.

5. Conclusion

V. splendidus 10/068 1T1 has been previously reported to be pathogenic to the blue mussel. In this study, we first investigated hemocyte bacteria interactions. *In vitro* challenge demonstrated the capacity of *Vibrio* strain to alter cell adhesion, phagolysosome maturation and viability. Then, we successfully established an experimental infection procedure without injury via cohabitation with septic mussels. Contrary to native *Vibrio* contaminating seawater, bacteria primed by a first host infection, were able to bypass defense barriers and were detected in diverse organs and in hemocytes. During this infectious process, the number as well as the viability of circulating hemocytes were altered. Taken together, our results confirm the virulence of *V. splendidus* 10/068 1T1 towards *M. edulis* hemocytes and suggest their use as pathogen vehicles to spread of infection in the whole organism and maybe to neighbor mussels via inter-organismal contaminated hemocyte horizontal transfers.

Acknowledgements

This work received fundings from the State/Region Plan Contract (CPER) allocated through the Research Federation FR CNRS 3730 SCALE /FED 4116 SCALE (Sciences Appliquées à L'Environnement), and DGAI support through National Reference Laboratory activities for mollusk diseases (Ifremer-La Tremblade). Yosra Ben Cheikh was a recipient for a Ph.D. grant from the Conseil Regional de Haute-Normandie. The authors are indebted to the marine fish farm Aquacaux (Octeville, France) for valuable technical assistance.

References

- Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., Ford, S.E., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following *in vivo* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 384–397. doi:10.1016/j.fsi.2005.05.013
- Allam, B., Paillard, C., Ford, S.E., 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis. Aquat. Organ.* 48, 221–231. doi:10.3354/dao048221
- Allam, B., Pales Espinosa, E., 2016. Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place? *Fish Shellfish Immunol.*, Special Issue: ISFSI 2016 53, 4–12. doi:10.1016/j.fsi.2016.03.037
- Araya, M.T., Siah, A., Mateo, D.R., Markham, F., McKenna, P., Johnson, G.R., Berthe, F.C.J., 2009. Morphological and Molecular Effects of *Vibrio splendidus* on Hemocytes of Softshell Clams, *Mya arenaria*. *J. Shellfish Res.* 28, 751–758. doi:10.2983/035.028.0403
- Armstrong, J.A., Hart, P.D., 1971. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J. Exp. Med.* 134, 713–740.
- Azéma, P., Travers, M.-A., De Lorgeril, J., Tourbiez, D., Dégremon, L., 2015. Can selection for resistance to OsHV-1 infection modify susceptibility to *Vibrio aestuarianus* infection in *Crassostrea gigas*? First insights from experimental challenges using primary and successive exposures. *Vet. Res.* 46. doi:10.1186/s13567-015-0282-0
- Balbi, T., Fabbri, R., Cortese, K., Smerilli, A., Ciacchi, C., Grande, C., Vezzulli, L., Pruzzo, C., Canesi, L., 2013. Interactions between *Mytilus galloprovincialis* hemocytes and the bivalve pathogens *Vibrio aestuarianus* 01/032 and *Vibrio splendidus* LGP32. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1906–1915. doi:10.1016/j.fsi.2013.09.027
- Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J.L., Figueras, M.J., 2010a. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 34–43. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00135.x
- Beaz-Hidalgo, R., Diéguez, A.L., Cleenwerck, I., Balboa, S., Doce, A., de Vos, P., Romalde, J.L., 2010b. *Vibrio celticus* sp. nov., a new *Vibrio* species belonging to the *Splendidus* clade with pathogenic potential for clams. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 311–315. doi:10.1016/j.syapm.2010.06.007
- Ben Cheikh, Y., Travers, M.-A., Morga, B., Godfrin, Y., Rioult, D., Le Foll, F., 2016. First evidence for a *Vibrio* strain pathogenic to *Mytilus edulis* altering hemocyte immune capacities. *Dev. Comp. Immunol.* 57, 107–119. doi:10.1016/j.dci.2015.12.014
- Ben-Haim, Y., Rosenberg, E., 2002. A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Biol.* 141, 47–55. doi:10.1007/s00227-002-0797-6

- Cabello, A.E., Espejo, R.T., Romero, J., 2005. Tracing *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Tiostrea chilensis*) using a Green Fluorescent Protein tag. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 327, 157–166.
- Choquet, G., Soudant, P., Lambert, C., Nicolas, J.-L., Paillard, C., 2003. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Organ.* 57, 109–116. doi:10.3354/dao057109
- Ciacchi, C., Betti, M., Canonico, B., Citterio, B., Roch, P., Canesi, L., 2010. Specificity of anti-*Vibrio* immune response through p38 MAPK and PKC activation in the hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 49–55. doi:10.1016/j.jip.2010.05.010
- Ciacchi, C., Citterio, B., Betti, M., Canonico, B., Roch, P., Canesi, L., 2009. Functional differential immune responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenge. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 153, 365–371. doi:10.1016/j.cbpb.2009.04.007
- Colwell, R.R., Grimes, D.J., 1984. *Vibrio* diseases of marine fish populations. *Helgoländer Meeresunters.* 37, 265–287. doi:10.1007/BF01989311
- De Decker, S., Normand, J., Saulnier, D., Pernet, F., Castagnet, S., Boudry, P., 2011. Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* infection in relation to their reproductive status. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 179–191. doi:10.1016/j.jip.2010.09.003
- De Decker, S., Saulnier, D., 2011. Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: Evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 691–699. doi:10.1016/j.fsi.2010.12.017
- Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzón, E., Caro, A., Rosa, R.D., Le Roux, F., Lautrédou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., de Lorgeril, J., Kieffer-Jaquinod, S., Bachère, E., Destoumieux-Garzón, D., 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2993–2998. doi:10.1073/pnas.1015326108
- Feldhusen, F., 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes Infect.* 2, 1651–1660. doi:10.1016/S1286-4579(00)01321-6
- Gay, M., Berthe, F.C.J., Le Roux, F., 2004. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Organ.* 59, 49–56. doi:10.3354/dao059049
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S., 2006. “Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* 253, 105–113. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.07.031
- Hasan, N.A., Grim, C.J., Lipp, E.K., Rivera, I.N.G., Chun, J., Haley, B.J., Taviani, E., Choi, S.Y., Hoq, M., Munk, A.C., Brettin, T.S., Bruce, D., Challacombe, J.F., Detter, J.C., Han, C.S., Eisen, J.A., Huq, A., Colwell, R.R., 2015. Deep-sea hydrothermal vent bacteria related to

human pathogenic *Vibrio* species. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, E2813–E2819. doi:10.1073/pnas.1503928112

Horwitz, M.A., 1983. The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. J. Exp. Med. 158, 2108–2126.

Isberg, R.R., O'Connor, T., Heidtman, M., 2009. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cozy niche inside host cells. Nat. Rev. Microbiol. 7, 13–24. doi:10.1038/nrmicro1967

Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L., 2009. Two pathogens of Greenshell mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius*-like isolate. J. Fish Dis. 32, 499–507. doi:10.1111/j.1365-2761.2009.01006.x

Kwan, T.N., Bolch, C.J.S., 2015. Genetic diversity of culturable *Vibrio* in an Australian blue mussel *Mytilus galloprovincialis* hatchery. Dis. Aquat. Organ. 116, 37–46. doi:10.3354/dao02905

Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., Nicolas, J.-L., 2006a. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. Microbes Infect. 8, 2715–2724. doi:10.1016/j.micinf.2006.07.020

Labreuche, Y., Soudant, P., Gonçalves, M., Lambert, C., Nicolas, J.-L., 2006b. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. Dev. Comp. Immunol. 30, 367–379. doi:10.1016/j.dci.2005.05.003

Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M., Poulet, S.A., 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). Dis. Aquat. Organ. 46, 139–145. doi:10.3354/dao046139

Lambert, C., Nicolas, J.-L., Cilia, V., 1999. *Vibrio splendidus*-related strain isolated from brown deposit in scallop (*Pecten maximus*) cultured in Brittany France). Bull Eur Fish Pathol 102.

Le Roux, F.L., Wegner, K.M., Polz, M.F., 2016. Oysters and Vibrios as a model for disease dynamics in wild animals. Trends Microbiol. 24, 568–580. doi:10.1016/j.tim.2016.03.006

Mateo, D.R., Siah, A., Araya, M.T., Berthe, F.C.J., Johnson, G.R., Greenwood, S.J., 2009. Differential *in vivo* response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: Changes in cell structure, numbers and adherence. J. Invertebr. Pathol. 102, 50–56. doi:10.1016/j.jip.2009.06.008

- Mersni-Achour, R., Imbert-Auvray, N., Huet, V., Ben Cheikh, Y., Faury, N., Doghri, I., Rouatbi, S., Bordenave, S., Travers, M.-A., Saulnier, D., Fruitier-Arnaudin, I., 2014. First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: II. Characterization of properties of the proteolytic fraction of extracellular products. *J. Invertebr. Pathol.* 123, 49–59. doi:10.1016/j.jip.2014.09.006
- Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R., Ansquer, D., 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Org. - Dis. AQUAT ORG* 27, 67–76. doi:10.3354/dao027067
- Nyholm, S.V., McFall-Ngai, M.J., 2003. Dominance of *Vibrio fischeri* in secreted mucus outside the light organ of *Euprymna scolopes*: the first site of symbiont specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3932–3937.
- Nyholm, S.V., Stabb, E.V., Ruby, E.G., McFall-Ngai, M.J., 2000. Establishment of an animal–bacterial association: Recruiting symbiotic vibrios from the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10231–10235. doi:10.1073/pnas.97.18.10231
- Paillard, C., Le Roux, F., Borrego, J.J., 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* 17, 477–498. doi:10.1051/alr:2004054
- Paillard, C., Maes, P., 1995. The Brown Ring Disease in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 91–100. doi:10.1006/jipa.1995.1015
- Powell, J.L., 1999. *Vibrio* species. *Clin. Lab. Med.* 19, 537–552, vi.
- Renwranz, L., Siegmund, E., Woldmann, M., 2013. Variations in hemocyte counts in the mussel, *Mytilus edulis*: similar reaction patterns occur in disappearance and return of molluscan hemocytes and vertebrate leukocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 164, 629–637. doi:10.1016/j.cbpa.2013.01.021
- Restif, O., Graham, A.L., 2015. Within-host dynamics of infection: from ecological insights to evolutionary predictions. *Phil Trans R Soc B* 370, 20140304. doi:10.1098/rstb.2014.0304
- Rosenberg, E., Falkovitz, L., 2004. The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 143–159. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123610
- Russell, D.G., 2001. Phagocytosis, in: eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Russell, D.G., Mwandumba, H.C., Rhoades, E.E., 2002. *Mycobacterium* and the coat of many lipids. *J. Cell Biol.* 158, 421–426. doi:10.1083/jcb.200205034
- Santos, M. de S., Orth, K., 2014. Intracellular *Vibrio parahaemolyticus* escapes the vacuole and establishes a replicative niche in the cytosol of epithelial cells. *mBio* 5, e01506-14. doi:10.1128/mBio.01506-14

- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M., Garcia, C., 2010. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microb. Ecol.* 59, 787–798. doi:10.1007/s00248-009-9620-y
- Tanguy, M., McKenna, P., Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Danger, J.-M., Siah, A., 2013. Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 419–429. doi:10.1016/j.dci.2012.10.015
- Thompson, F.L., Iida, T., Swings, J., 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 403–431. doi:10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004
- Travers, M.-A., Boettcher Miller, K., Roque, A., Friedman, C.S., 2015. Bacterial diseases in marine bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* doi:10.1016/j.jip.2015.07.010
- Vanhove, A.S., Rubio, T.P., Nguyen, A.N., Lemire, A., Roche, D., Nicod, J., Vergnes, A., Poirier, A.C., Disconzi, E., Bachère, E., Le Roux, F., Jacq, A., Charrière, G.M., Destoumieux-Garzón, D., 2016. Copper homeostasis at the host *Vibrio* interface: lessons from intracellular vibrio transcriptomics. *Environ. Microbiol.* 18, 875–888. doi:10.1111/1462-2920.13083
- Weiss, G., Schaible, U.E., 2015. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.* 264, 182–203. doi:10.1111/imr.12266
- Zhang, L., Krachler, A.M., Broberg, C.A., Li, Y., Mirzaei, H., Gilpin, C.J., Orth, K., 2012. Type III effector VopC mediates invasion for *Vibrio* species. *Cell Rep.* 1, 453–460. doi:10.1016/j.celrep.2012.04.004

Figure legend

Figure 1. Effect of *V. splendidus*-related strains on hemocyte adhesion *in vitro*. The number of non-adherent cells was evaluated after exposure to the virulent *V. splendidus* 10/068 1T1 and to the avirulent *V. splendidus* 12/056 M24T1 for 2, 4 and 6h. Data are expressed as means $\pm$ SEM (n=5), * indicates values significantly different from control and § marks results that significantly differ from values obtained with the avirulent bacteria 12/056 M24T1 ($p < 0.05$, Student's t-test)

Figure 2. Acidic vacuole formation in hemocytes after exposure to *V. splendidus*-related strains. (a) Flow cytometry analysis of hemocytes exposed *in vitro* to virulent or non-virulent bacteria during 2h and incubated 30 min with lysotracker at 0.4 μ M. Data are expressed as means of fluorescence $\pm$ SEM, arbitrary units (A.U.), n=5. *** indicates values significantly different from the control (Student's t-test, $p < 0.001$). (b) Fluorescence microscopy of hemocytes exposed *in vitro* to virulent or non-virulent bacteria during 2h and incubated with lysotracker green (0.4 μ M, 30 min) and Hoechst 33342 (5 μ M, 15 min).

Figure 3. Effect of exposure to bacteria on hemocyte viability *in vitro*. Hemocytes were incubated with *V. splendidus*-related strains 10/068 1T1 or 12/056 M24T1 for different time durations. Viability was determined by flow cytometry after propidium iodide staining. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n=4). ** indicates values significantly different from the control (Student's t-test, $p < 0.01$).

Figure 4. Cumulative mortalities recorded after experimental infections of adult mussels *in vivo* by water tank cohabitation with septic mussels. The GFP tagged *V. splendidus* 10/068 1T1 strain was injected intramuscularly to mussels. Twenty four hours after injection, moribund animals were sacrificed and placed in water tank cohabitation with healthy mussels for 72h and then removed. Cohabitation assays with mussels injected with FSSW were used as control. Data are means $\pm$ SEM of cumulative mortalities in triplicate tanks.

Figure 5. Bacteria count in water tank seawater during experimental infections *in vivo* by cohabitation with septic mussels. Seawater was sampled daily during cohabitation assays and plated on LBS kanamycin agar plates. Bacteria concentration was determined over time (CFU/mL, mean $\pm$ SEM, n=3).

Figure 6. Analysis of hemocyte parameters during experimental infections *in vivo* by water tank cohabitation with septic mussels. Moribund mussels were obtained as in figure 4. Hemolymph was sampled over time from cohabited mussels and (a) hemocyte concentration, (b) percentage of hemocyte containing GFP bacteria and (c) hemocyte viability were monitored by flow cytometry. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n=4-13). Values significantly different from control are indicated (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Student's t-test).

Figure 7. Histological observations of mussel tissues during experimental infections by *V. splendidus* 10/068 1T1 via water tank cohabitation with septic mussels. GFP-tagged bacteria were detected by immunohistochemistry (pink labeling). Tissues were counter-colored. A-C: Gills, D: esophagi and stomach. Scale bars of 50 or 100 μm are indicated.

Supplementary figure 1. Histological observations of hematoxylin-eosin stained sections of mussel tissues during experimental infections by water tank cohabitation with septic mussels. A. Unidentified trematod in digestive glands (metacercaria), B. *Mytilicola* sp. in digestive light, C. Unidentified copepod and hemocytes infiltration in gills, D. Bacteria, ciliates and gills necrosis, E. Digestive glands and esophagi necrosis, F. Inflammatory granulomas. Scale bars of 100 μm , 250 μm , 500 μm or 1 mm are indicated.

Table 1: Histological observations on hematoxylin-eosin stained sections of mussel tissues during experimental infections by water tank cohabitation with septic mussels. Presence of micro-organisms and lesions (as necrosis, infiltrations or granulomas) were noticed and classified in categories (0, 1, 2 or 3) as defined in material and methods section. A total of 40 individuals were observed (21 males, 19 females; 38 live sacrificed animals, 9 moribunds). Number of observations is indicated, as well as the number of included moribunds in this count (includ. xM = including x moribunds).

	Absence (0)	Low (1)	Moderate (2)	High (3)
Presence of noticeable protozoan	40 (includ. 9M)			
Trematods in digestive gland or mantle	4 (includ. 2M)	21 (includ. 5 M)	15 (includ. 2M)	
Copepods (<i>Mytilicola</i> sp.) in digestive light	37 (includ. 9M)	3 (includ. 0M)		
Ciliophora in digestive gland epithelium	35 (includ. 9M)		5 (includ. 0M)	
Ciliates in pallial cavity or digestive gland	12 (includ. 1M)	21 (includ. 3M)	5 (includ. 4M)	2 (includ. 1M)
Gregarines in mantle	33 (includ. 7 M)	7 (includ. 2M)		
Bacteria in gills and pallial cavity	23 (includ. 0M)	8 (includ. 4M)	6 (includ. 2M)	3 (includ. 3M)
Bacteria in digestive glands and esophagi	30 (includ. 3M)	6 (includ. 3M)	4 (includ. 3M)	
Bacteria in mantle	31 (includ. 2M)	3 (includ. 1M)	6 (includ. 6M)	
Necrosis of gills	10 (includ. 0M)	20 (includ. 5M)	7 (includ. 1M)	3 (includ. 3M)
Necrosis of digestive gland or esophagi epithelium	32 (includ. 9M)	4 (includ. 1M)	4 (includ. 0M)	
Hemocyte infiltrations in digestive gland, mantle or gills	16 (includ. 4M)	12 (includ. 1M)	12 (includ. 4M)	
Granulomas	23 (includ. 9M)	10 (includ. 0M)	5 (includ. 0M)	2 (includ. 0M)

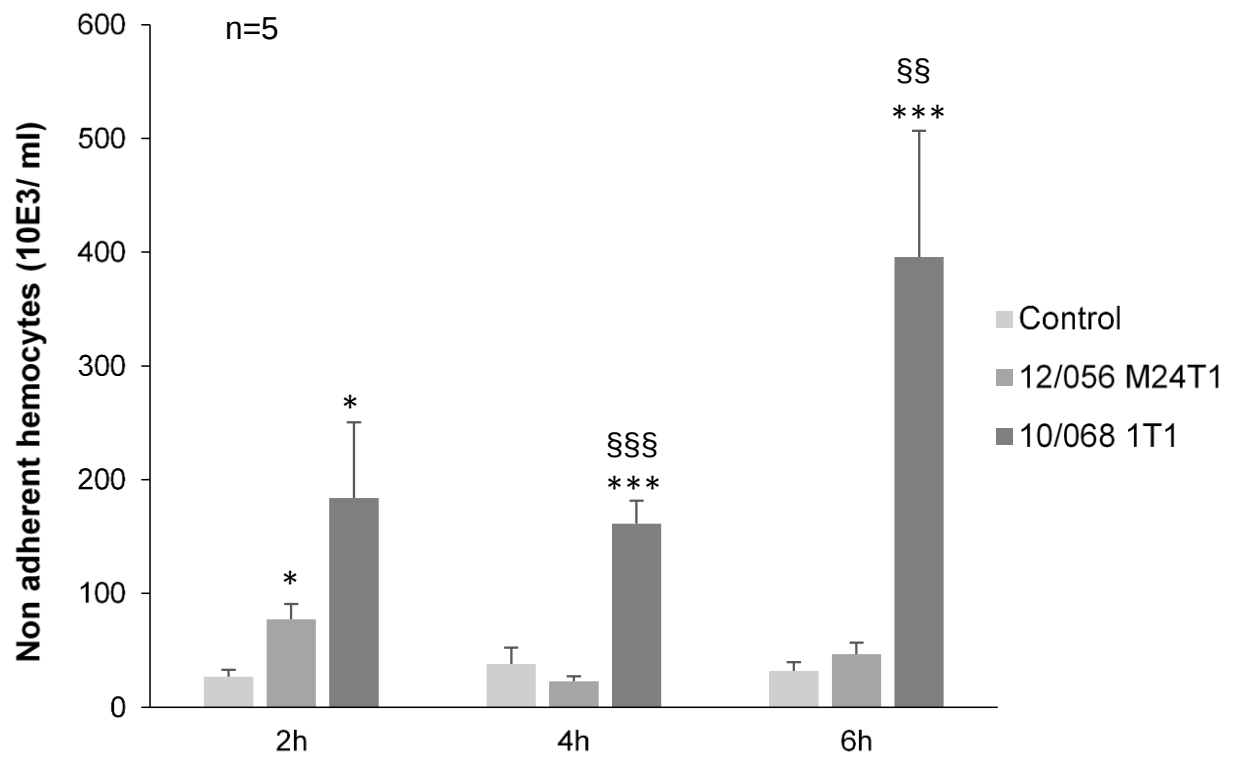


Figure 1. Effect of *V. splendidus*-related strains on hemocyte adhesion *in vitro*.

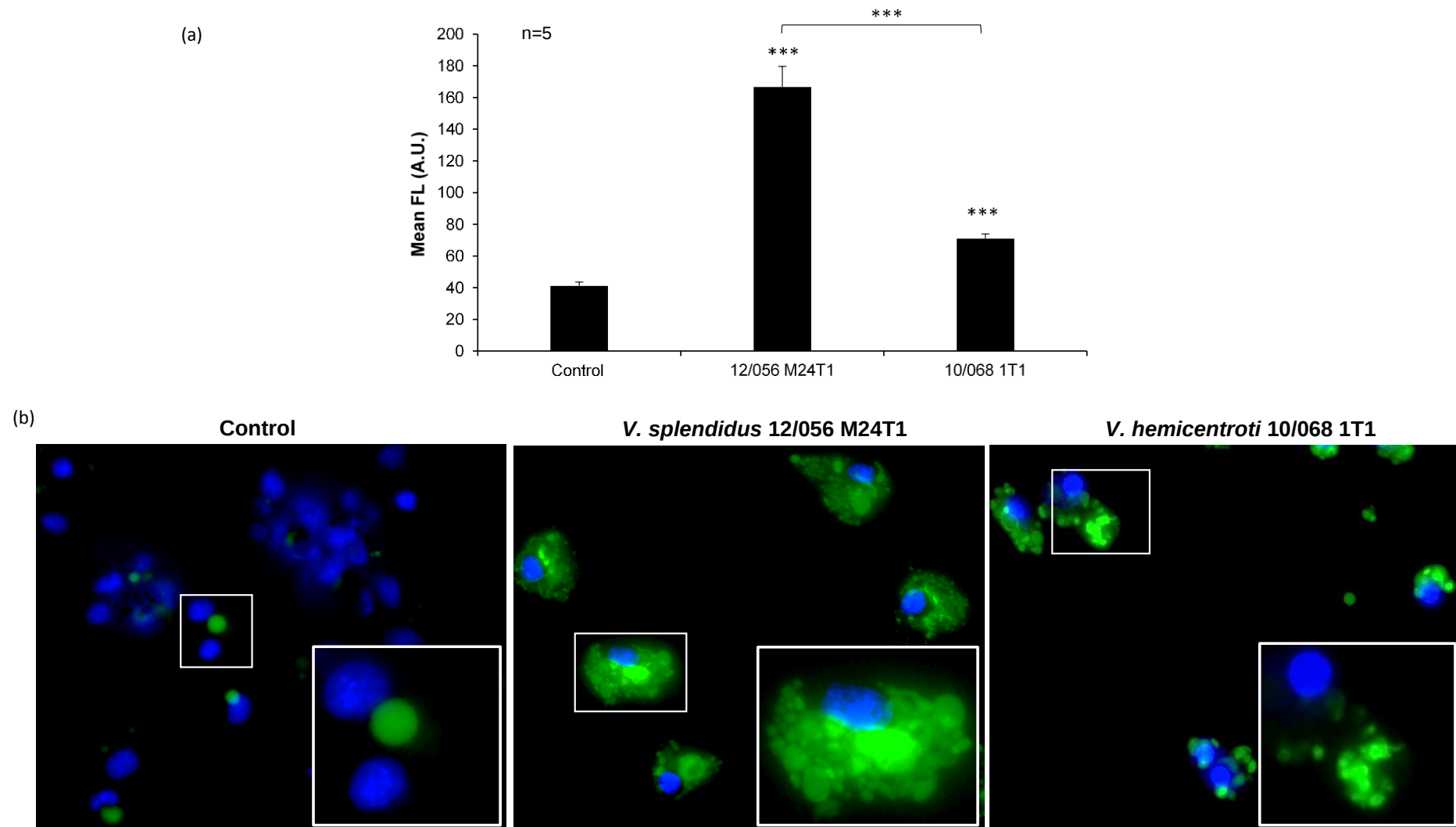


Figure 2. Acidic vacuole formation in hemocytes after exposure to *V. splendidus*-related strains.

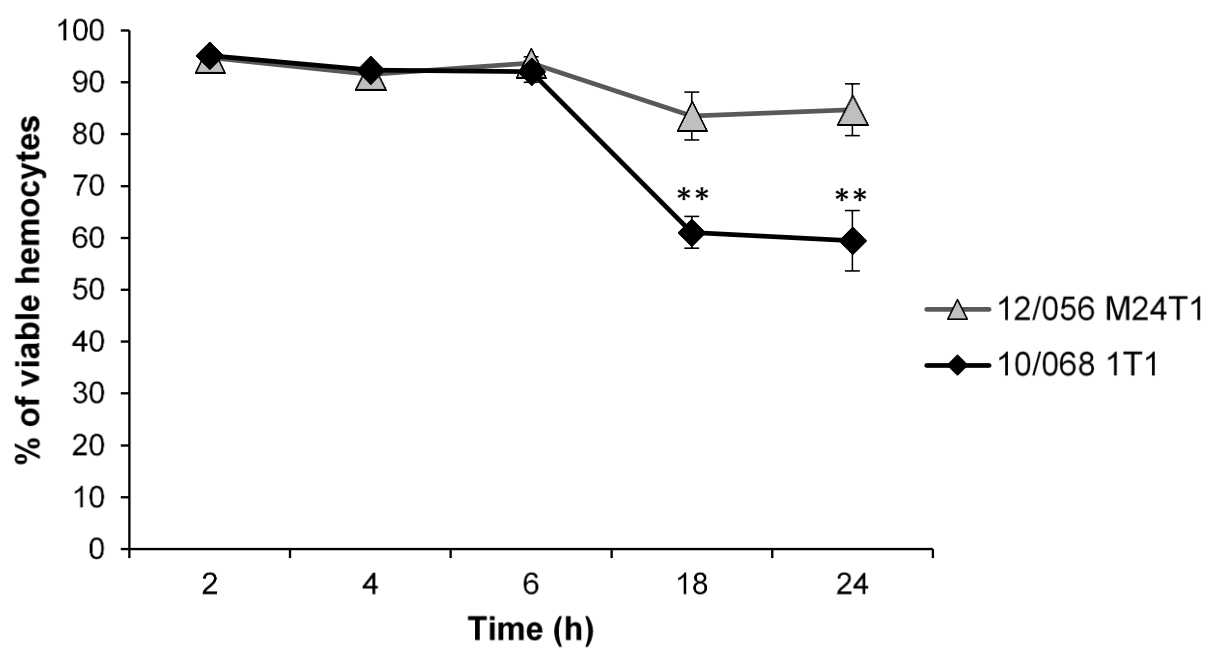


Figure 3. Effect of exposure to bacteria on hemocyte viability *in vitro*.

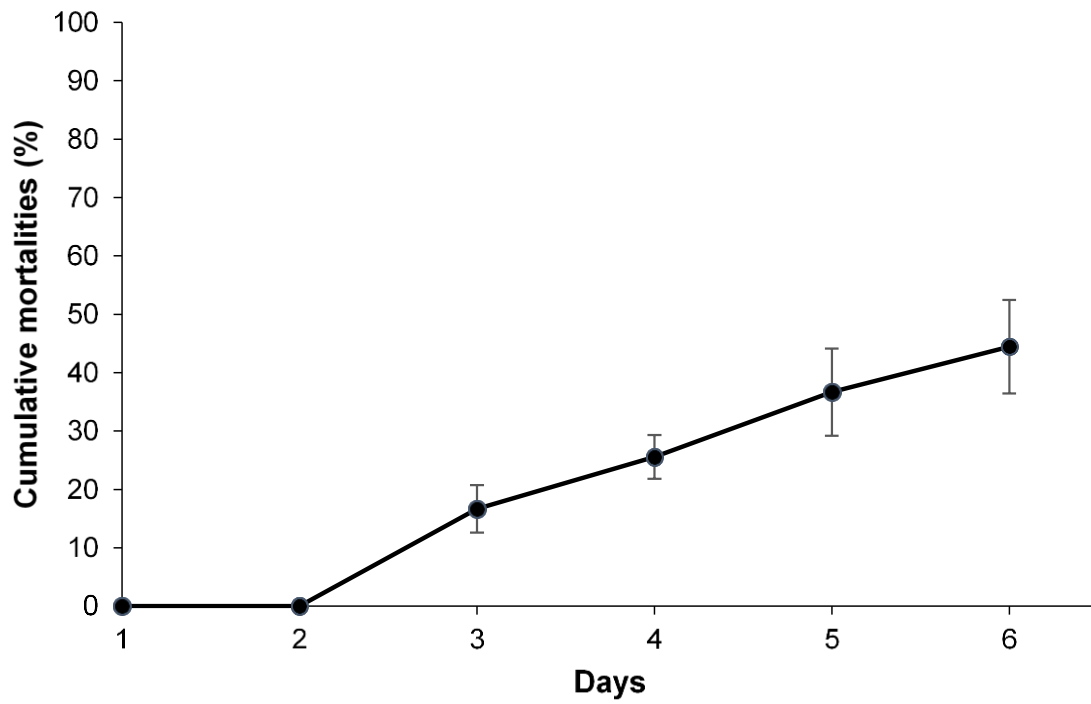


Figure 4. Cumulative mortalities recorded after experimental infections of adult mussels *in vivo* by water tank cohabitation with septic mussels.

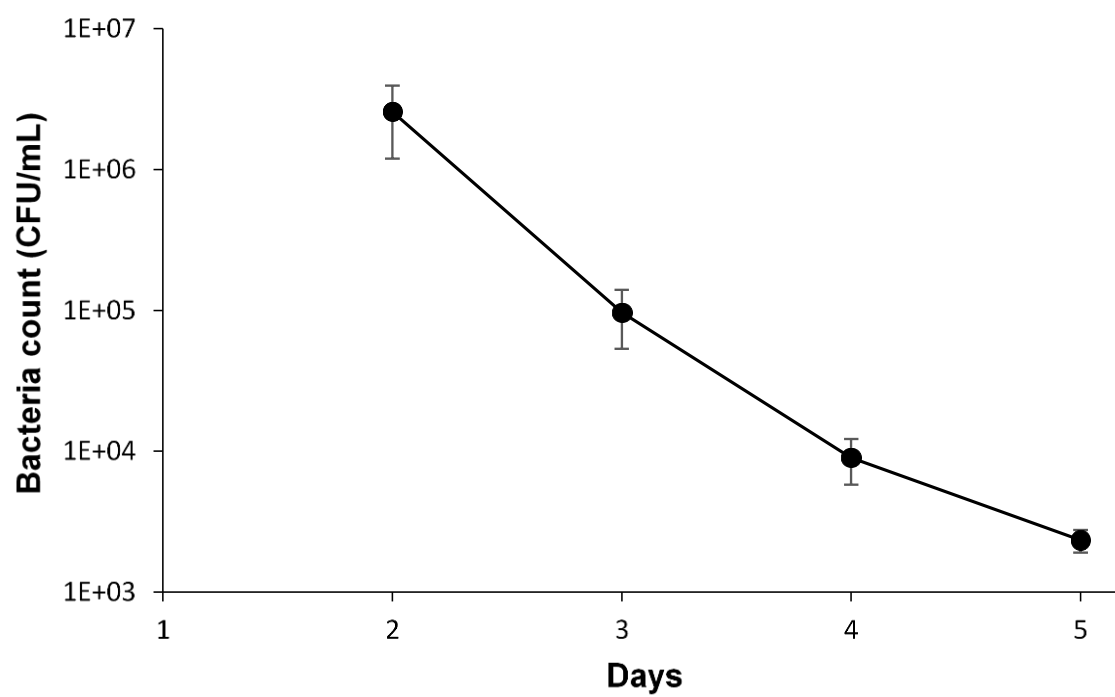


Figure 5. Bacteria count in water tank seawater during experimental infections *in vivo* by cohabitation with septic mussels.

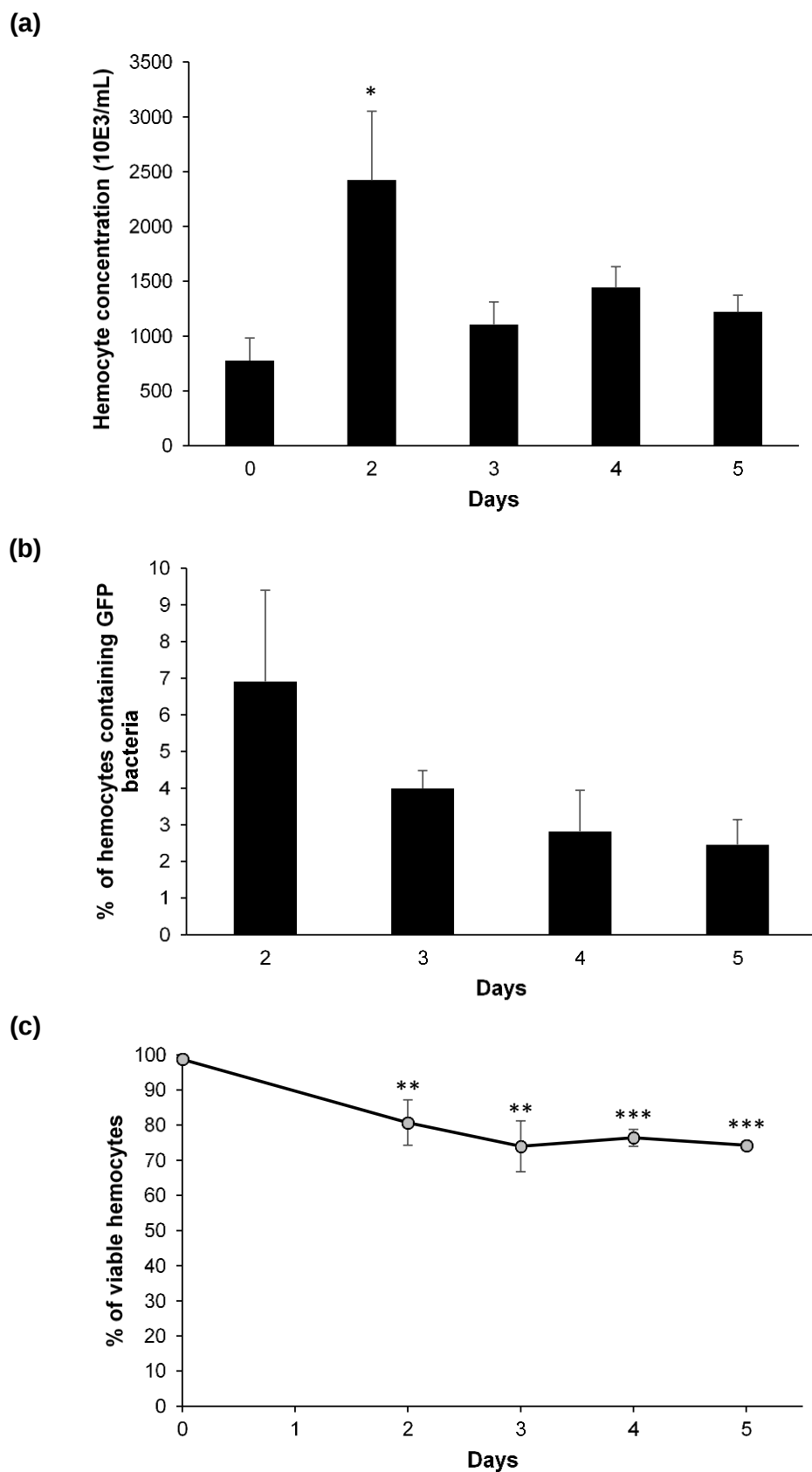


Figure 6. Analysis of hemocyte parameters during experimental infections *in vivo* by water tank cohabitation with septic mussels

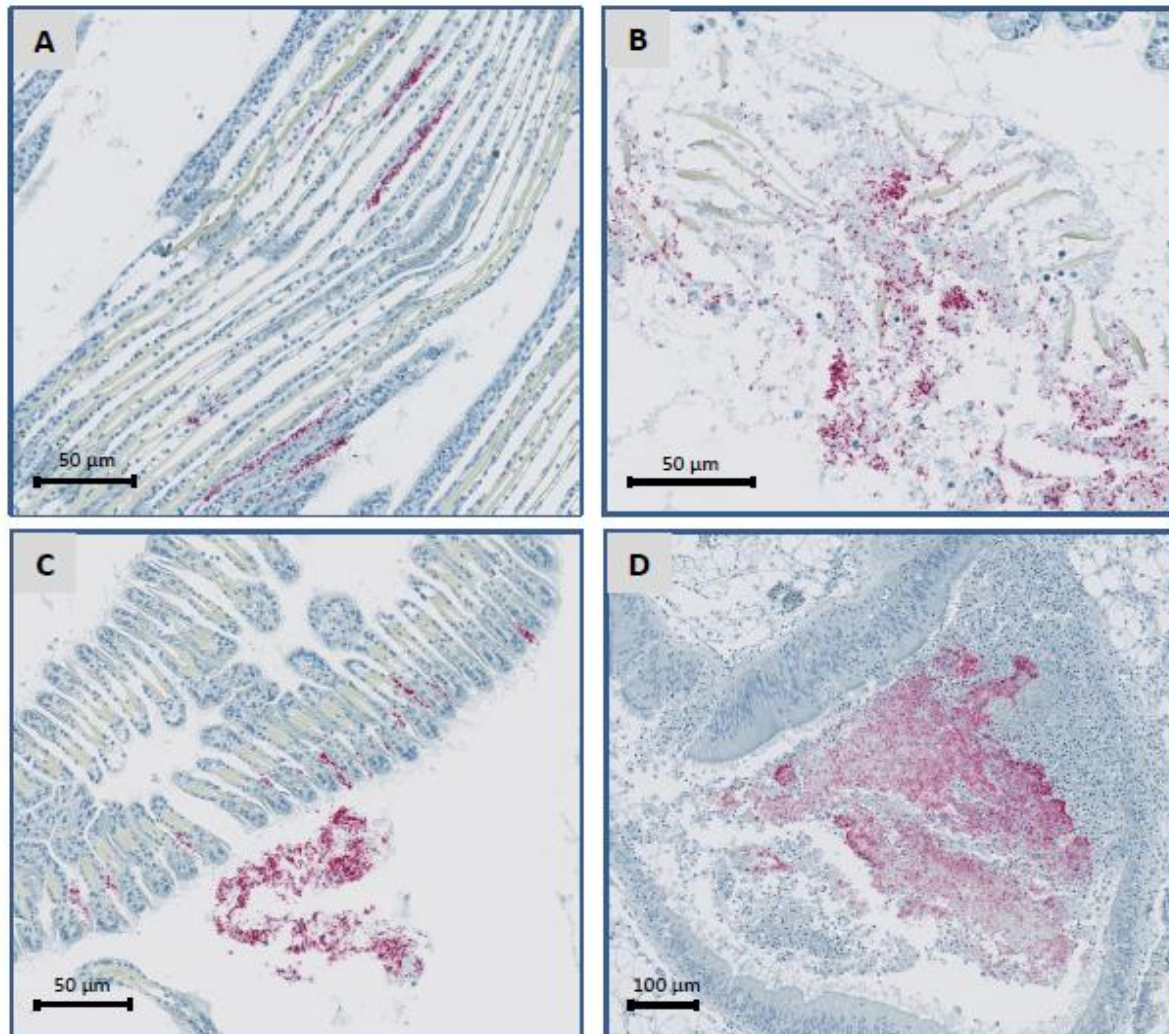
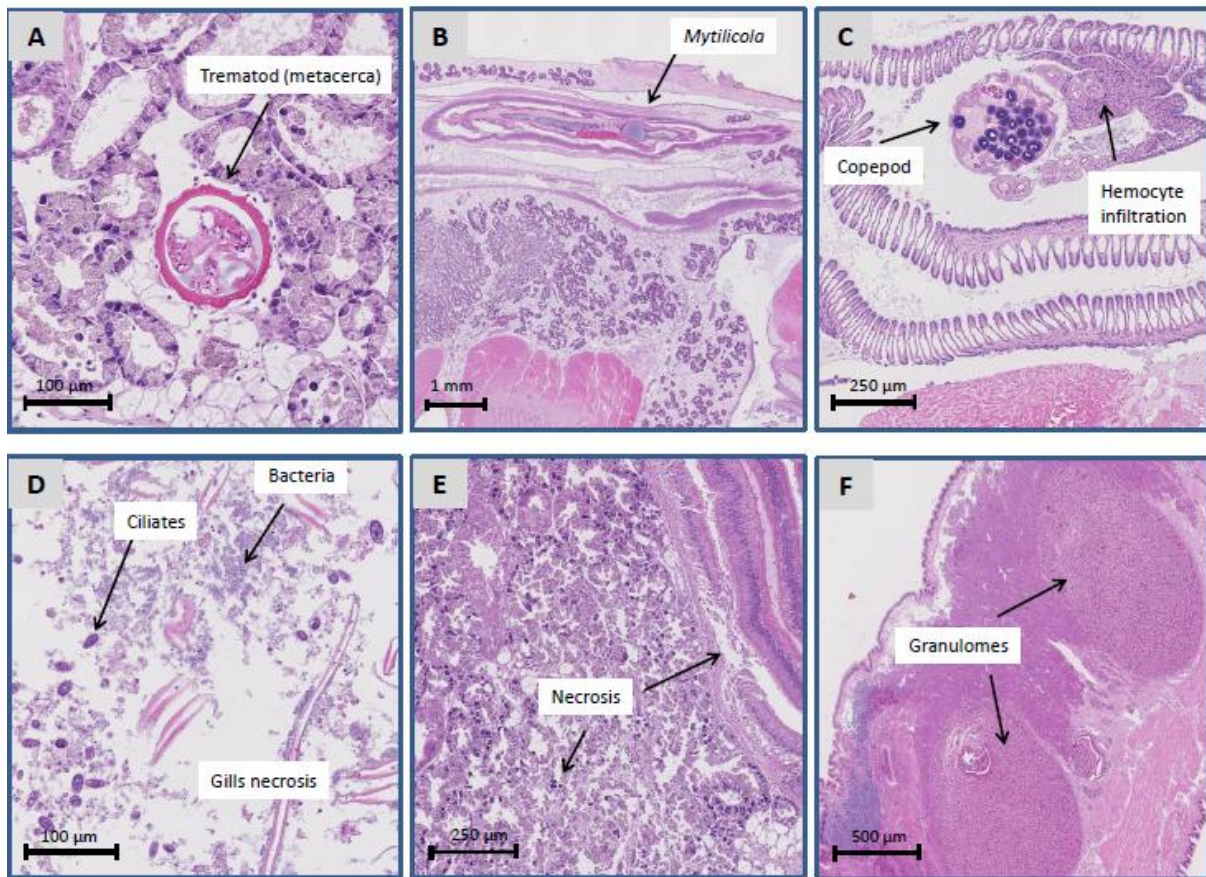


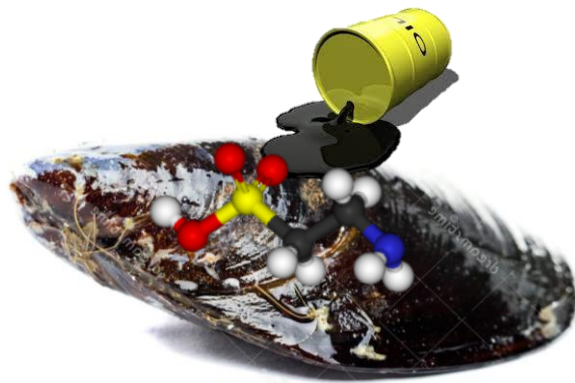
Figure 7. Immunohistological localization of *Vibrio splendidus* 10/068 1T1 in *Mytilus edulis* tissues during infection.



*

Supplementary figure 1. Histological observations of hematoxylin-eosin stained sections of mussel tissues during experimental infections by water tank cohabitation with septic mussels

Chapitre 2: étude du système MXR et de sa modulation par les contaminants chimiques chez *Mytilus edulis*



Comme indiqué dans l'introduction bibliographique, peu de données sont disponibles sur le fonctionnement du système MXR chez les bivalves. La plupart des études se limitent à la détection moléculaire ou protéique du transporteur ABC le plus connu, la P-gp.

Ce chapitre apporte des informations sur les effecteurs du système MXR chez la moule bleue. L'étude a été faite sur les branchies en tant que tissu majoritairement exposé aux contaminants présents dans l'eau et sur les hémocytes du fait de leur importance dans le système immunitaire. L'article 3 décrit la caractérisation moléculaire et fonctionnelle d'un nouveau transporteur ABCG2 dans les hémocytes et les branchies. Par la suite l'article 4 étudie la modulation de l'expression génique des trois pompes connues par les contaminants chimiques (au laboratoire et sur le terrain) et la variation saisonnière.

La démarche expérimentale suivie est représentée dans Figure 24.

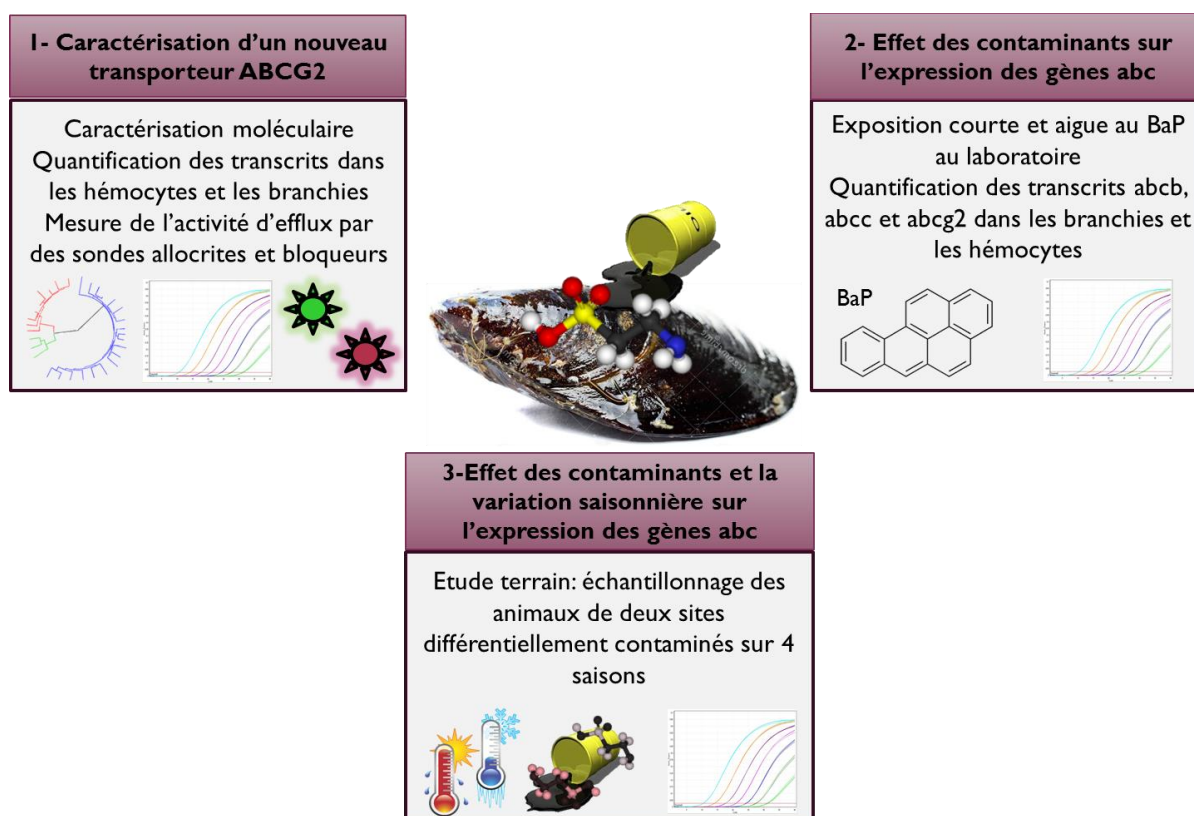


Figure 24. Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale suivie pour l'étude du système MXR chez *M. edulis* et sa modulation par les contaminants chimiques

Article 3: MXR chez *Mytilus edulis* : Caractérisation moléculaire et fonctionnelle du transporteur ABCG2 dans les hémocytes et les branchies

En préparation

Parmi les mécanismes de protection cellulaire, les transporteurs ABC jouent un rôle important dans l'efflux des xénobiotiques chez les organismes marins. Deux pompes ABCB et ABCC ont été identifiées chez la moule bleue. Dans ce travail, un nouveau transporteur ABC appartenant à la famille G2 est décrit.

L'ABCG2 était exprimé dans les hémocytes et les branchies de *Mytilus edulis* avec un niveau de transcrits plus abondant dans les branchies. La séquence protéique obtenue contient les motifs conservés des pompes ABC. De plus, elle présente une forte homologie avec les autres ABCG2 des différentes espèces de vertébrés et invertébrés. Sur le plan structural, la protéine a la conformation typique d'un demi transporteur, composée d'une région cytoplasmique NBD suivie d'un domaine transmembranaire organisé en 6 hélices. L'activité d'efflux a été également mesurée en combinant les sondes allocrites pheophorbide A et bodipy prazosin avec des inhibiteurs spécifiques. Dans les hémocytes, la distribution de la fluorescence varie en fonction des sondes utilisées et des populations cellulaires. Tandis que dans les branchies l'activité semble être plus localisée au centre et au pôle antérieur pour les deux substrats. En présence de la plupart des inhibiteurs, la fluorescence accumulée des sondes augmente indiquant un blocage de l'activité. De plus, le bloqueur MK571, connu pour son action envers la MRP, montre une polyspécificité en agissant sur l'activité de l'ABCG2.

Dans l'ensemble, les résultats montrent que plusieurs transporteurs contribuent au phénotype MXR chez la moule bleue. En outre, la spécificité des outils utilisés pour la mesure des activités d'efflux et la distinction des pompes est discutée.

Multixenobiotic resistance in *Mytilus edulis*: molecular and functional characterization of an ABCG2- type transporter in hemocytes and gills

Yosra Ben Cheikh^a, Benoit Xuereb^a, Céline Boulangé-Lecomte^a and Frank Le Foll^a

Authors affiliation

^aUniversity of Le Havre Normandy, Environmental Stress and Aquatic Biomonitoring, UMR-I 02 SEBIO, 25 rue Philippe Lebon, F-76063 Le Havre, France

Abstract

Among the cellular protection arsenal, ABC transporters play an important role in xenobiotic efflux in marine organisms. Two pumps belonging to B and C subfamily has been identified in *Mytilus edulis*. In this study, we investigated the presence of the third major subtype ABCG2/BCRP protein in mussel tissues. Transcript was expressed in hemocytes and with higher level in gills. Molecular characterization revealed that mussel ABCG2 transporter share sequence and organizational structure with mammalian and molluscan orthologs. Overall identity of the amino acid sequence with corresponding homologs from other organisms was comprised between 49% and 98%. Furthermore, protein efflux activity was demonstrated using a combination of fluorescent allocrites and specific inhibitors. The accumulation of bodipy prazosin and pheophorbide A was heterogeneous in gills and hemocytes. Most of the used blockers enhanced probe accumulation at different levels, more significantly for bodipy prazosin. Moreover, Mrp classical blocker MK571 showed a polyspecificity.

In conclusion, our data demonstrate that several ABC transporters contribute to MXR phenotype in the blue mussel including ABCG2 that form an active pump in hemocytes and gills. Efforts are needed to distinguish between the different members and to explore their single function and specificity towards allocrites and chemosensitizer.

1. Introduction

The aquatic environment is polluted by a variety of chemical compounds and heavy metals released by urban communities and industrial plants. Many of these xenobiotics are known to be a threat to most marine species health due to their environmental persistence, bioaccumulation in various tissues and intrinsic toxicity ([Anita H Poulsen, 2012](#); [Giarratano et al., 2010](#)). Bivalves of the genus *Mytilus* are of particular interest because of their resistance to chemical contaminants. These bioindicator species are therefore used as sentinel organisms. Immunological responses mediated by hemocytes are frequently investigated to monitor biological effects of water pollution ([Akaishi et al., 2007](#); [Auffret et al., 2006](#); [Gupta and Singh, 2011](#)).

In order to survive, marine organisms have developed strategies to overcome adverse effects of pollutants. Bivalves can limit their exposure to toxic compounds using behavioural responses such as shell closure and restriction of filtration rate ([Haberkorn et al., 2011](#); [Hégaret et al., 2007](#)). Furthermore, they possess multiple cellular detoxification mechanisms that can influence the uptake, distribution and elimination of xenobiotics ([Farris and Hassel, 2006](#)). Among the arsenal of enzymes involved in animal cell detoxification, some members of the ATP Binding Cassette (ABC) superfamily are found ([Bard, 2000](#); [Luckenbach et al., 2008](#); [Riout et al., 2014](#)).

ABC transporters were first described for their role in multidrug resistance (MDR) to chemotherapeutic drugs ([Gottesman and Ling, 2006](#); [Nielsen and Skovsgaard, 1992](#); [Sharom, 2008](#)). These ATP-powered transmembrane proteins found in tumor cells of mammals are one of the major cause of chemotherapeutic failure in cancer therapy. They actively pump out of the cytosol into the external medium a multitude of distinct cytotoxic compounds ([Kathawala et al., 2015](#)). Similarly to this efflux-based drug resistance, a xenobiotic transport mediated by ABC proteins was demonstrated for the first time in fresh water mussels as a strategy to defense against pollutants ([Kurelec, 1992](#); [Kurelec and Pivcević, 1989](#)). Considering the variety of chemically unrelated compounds carried by this system, Kurelec coined the term of Multixenobiotic Resistance (MXR) by analogy to the MDR phenotype ([Kurelec, 1992](#)). In marine organisms, ATP-fueled pumps act as a first line of defense, preventing toxic chemicals from entering the cell. Secondly, if toxicants even enter the cytoplasm, ABC transporters can be the last protection by expelling the toxicants and associated metabolites ([Epel et al., 2008](#)).

The MXR phenotype is supposedly ubiquitous in aquatic invertebrates. Functional and molecular assays allowed the identification and characterization of some ABC transporters members in several species including sponges ([Kurelec et al., 1992](#)), innkeeper worms ([Toomey and Epel,](#)

1993), molluscs (Faria et al., 2011; Luckenbach and Epel, 2008; McFadzen et al., 2000; Navarro et al., 2012; Rioult et al., 2014) and crabs (Köhler et al., 1998; Minier et al., 2008).

The three major types of MDR proteins in humans include members of the ABCB, the ABCC and the ABCG2 subfamilies (Sarkadi et al., 2006). In marine invertebrates, only ABCB and ABCC transporters have been well described. Two complete sequences analog to ABCB/P-glycoprotein (P-gp) and ABCC/MDR-related protein (MRP) subfamilies were identified in the Californian mussel (Luckenbach and Epel, 2008). Furthermore, efflux activities have been confirmed using functional efflux assays with substrates and inhibitors (Luckenbach et al., 2008; Luckenbach and Epel, 2008). Similarly, P-gp transcript as well as pump activity were characterized in the Asian green mussel *Perna viridis* (Huang et al., 2014). In *Mytilus edulis*, Luedeking and co-authors obtained fragments of abcb and abcc sequences in various tissues and MXR transcript levels were measured in gills, mantle and digestive gland (Luedeking et al., 2005; Luedeking and Koehler, 2002). Lately, ABCC/MRP transporter was detected in blue mussel hemocytes. Authors demonstrated that pump activity was principally supported by the hemocyte subpopulation eosinophilic granulocytes (Rioult et al., 2014). To our knowledge, only few studies explored the presence of ABCG2/BCRP transporter in bivalves. Protein and gene expression were quantified respectively in the Indian rock oyster *Saccostrea forskali* (Kingtong et al., 2007) and the Asian clam *Corbicula fluminea* (Chen et al., 2015).

In this study, we investigate the existence of the third major type of MDR proteins ABCG2 in blue mussel hemocytes and gills. Complete ABCG2 amino acid sequence was identified and characterized. Therefore, ABCG2 gene expression was quantified and transcript levels were compared in mussel tissues. For determining whether ABCG2 transporter is active in *M. edulis* hemocyte subpopulations and gills, dye efflux assays were performed using fluorescent substrates combined with specific blockers.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Bodipy prazosin (Invitrogen Life technologies) and pheophorbide A (Sigma Aldrich) were used as fluorescent dyes and substrates of BCRP. Inhibitors of ABC transporters described in **Table 1** were purchased from Sigma Aldrich and Tebu-bio for Ko134.

2.2. Mussel and tissue collection

Adult mussels, *M. edulis* with shell length ranging from 4 to 5 cm, were collected on the intertidal rocky shore of Yport (0°18'52"E:49°44'30"N, France) between April 2014 and December 2015, immediately transported to the laboratory and placed in a temperature-controlled (10°C) aerated Biotop Nano Cube 60 seawater tank (Sera, Heinsberg, Germany), equipped with mechanical and activated biological filtering. The animals were fed with algae (*Isochrysis galbana*) and maintained in these conditions for at least one week before use.

Hemolymph was withdrawn from the posterior adductor muscle sinus, by gentle aspiration with a 1 mL syringe equipped with a 22G needle. For RNA extraction, pooled aliquots from 10 mussels were centrifuged 5 min at 1200 g. Gills were gently removed from mussel and immediately used in RNA extraction. For efflux activity assays, tissues were kept entire or excised using biopsy punches (6 mm diameter) to obtain disks.

2.3. RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from hemocytes or from gills using RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacture's recommendations. RNA suspensions were treated with DNase (Turbo DNA free kit, Ambion) for genomic DNA removal. Total RNA concentration was analyzed by spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Scientific). RNA integrity was checked by electrophoresis on 1 % agarose gel with SYBR staining (SYBR Safe DNA gel stain, Invitrogen). Reverse transcription was carried from total RNA (1 µg) using M-MLV RNase H minus (100U, Promega) and oligo(dT)20 (1 µg) in the presence of Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (80U, Promega). Complementary first-strand DNA (cDNA, 40 µL) were diluted in 60 µL of ultra-pure water and stored in 5 µL aliquots at -20°C until use.

2.4. Gene fishing and analysis of transporter sequence

The primers used in gene fishing were directed against sequence of *abcg2* ortholog from *Mytilus galloprovincialis* (Genbank accession number gi|406717747) and designed using Primer3 software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>, Table 2). PCR was performed on cDNA gills using Taq'Ozyme purple mix (Ozyme). After an initial denaturation step at 95°C for 2 min, 45 cycles were performed including a denaturation step at 95°C for 30 s, annealing at 62°C for 30 s and extension at 72°C for 1 min. The final extension step was continued for 5 min. The amplified PCR products were purified from 1.2% agarose gel using QIAquick gel extraction kit (Qiagen). Partial cDNA sequences were obtained after sequencing and blasted with *abcg2* cDNA from other organisms to verify the homology (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

The 5' cDNA of *Mytilus edulis* abcg2 was obtained by 5'RACE PCR using SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech) according to the user's manual. The 5'RACE product was amplified by PCR using gene specific primer (**Table 2**) and universal primer mix supplied with the RACE PCR kit. PCR was performed in a touchdown mode: 5 cycles at 94°C (30 s)/72°C (3 min), 5 cycles 94°C (30 s)/70°C (30 s)/72°C (3 min) and 25 cycles 94°C (30 s)/68°C (30 s)/72°C (3 min). Amplified products were gel purified, cloned and sequenced. The resulting PCR and RACE PCR sequences were assembled using Geneious R7.1.9 software. In order to get the whole open reading frame and to confirm assembled sequences, a PCR reaction was performed using primers directed against *Mytilus edulis* abcg2 (**Table 2**) following the same cycling conditions cited previously.

Final sequence was analyzed using tools at expasy (<http://web.expasy.org/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and cbs server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>). Multiple sequence alignment and determinations of identity rates between amino acid sequences of ABC transporters from different organisms were performed using Clustal W2. Phylogenetic tree was built according to Neighbor-Joining method using Geneious R7.1.9 software.

2.5. Quantitative real-time polymerase chain reaction

QPCR analysis was conducted on the Rotor-Gene Q 2- plex HRM (QIAGEN, Courtaboeuf, France) using the QuantiTect® SYBR® Green Master Mix (2X, QIAGEN). Each reaction was run in duplicate with a final volume of 20 µL containing 5 µL cDNA and 0.5 µM of each primer. Specific qPCR primers for abcg2-like and the housekeeping (hk) Elongation factor *ef1α* were designed using ProbeFinder software (<https://lifescience.roche.com/>, **Table 2**). The *ef1α* was chosen as hk gene because of its stability from different experimental conditions (Lacroix et al., 2014)

Reactions were initiated with an initial denaturation for 15 min at 95 °C followed by 45 cycles at 94 °C for 15 s, 59 °C for 30 s and 72 °C for 6 s. The melting curve was finally determined during a slow temperature elevation from 60 to 95 °C (1°C.s⁻¹). The run included blank controls (water). For the qPCR efficiencies of each primer pair used, standard curves were generated using eight serial dilutions of cDNA (from 10⁹ to 10¹ copies) (Xuereb et al., 2012). The level of expression of the target genes, normalized to the *ef1α* housekeeping gene, was then calculated using the $(1+efficiency)^{-\Delta Ct}$ formula.

2.6. Analysis of MXR activity

MXR activity was assessed in hemocytes by flow cytometry and in gills by microplate reader assays using dye efflux assays in absence or presence of inhibitors.

2.6.1. MXR activity in hemocytes

Crude hemolymph was placed into individual wells of 24-well tissue-culture plates (Greiner) and cells allowed to adhere for 15 minutes at 15 °C. The hemolymph was removed and replaced with 400 µL of marine physiological saline solution (MPSS, pH 7.8, 0.2 µm filtered) alone for the control or containing ABC transporter inhibitors at 30 µM final concentration. After 30 min of incubation at 15°C, fluorescent dyes were added: pheophorbide A at 5 µM or bodipy prazosin at 0.5 µM and incubated 15 min at 15 °C. Supernatants were gently aspirated and attached cells were removed by adding cold Alsever's solution (300 mM NaCl, 100 mM Glucose, 30 mM sodium Citrate, 26 mM citric acid, 10 mM EDTA, pH 5.4) and immediately analyzed by Cell Lab Quanta SC MPL flow cytometer (Beckman Coulter).

2.6.2. MXR activity in gills

Entire gills or tissue disks obtained by biopsy punches, were placed into individuals wells of 12-well plates (Greiner) or black 96-well plates (nunc) filled with MPSS. ABC transporter inhibitors were added at 30 µM and incubated for 30 min at 15 °C. Thereafter, pheophorbide A (5 µM) or bodipy prazosin (0.5 µM) were added for 15 min at 15 °C. Cell disks were transferred in new wells containing MPSS to remove the probe excess. The fluorescence accumulated was measured with a microplate reader (Tecan, excitation/ emission wavelength in nm: 490/530 for bodipy prazosin and 395/670 for pheophorbide A).

Mean values of fluorescence were plotted and compared. A MXR activity factor (MAF) was calculated using the following formula: $100 * \left(\frac{\text{MFL inhibitor} - \text{MFL ctrl}}{\text{MFL inhibitor}} \right)$ wherein MFL inhibitor and MFL ctrl are the mean fluorescence intensity values measured in the presence and absence of inhibitor (Lebedeva et al., 2011).

2.7. Statistical analyses

Statistical analysis was performed by using SigmaPlot 12 (Systat Software Inc., Chicago, IL). Replicates were averaged and the values were tested for normality (Shapiro-Wilk) and paired comparisons were performed by Student's t-tests. Statistical significance was accepted for *p < 0.05, **p < 0.01 or ***p < 0.001.

3. Results

3.1. Identification and phylogenetic analysis of ABCG2 transporter

The expression of ABCG2 gene in *Mytilus edulis* gills was investigated by RT PCR. The amplified product had the expected size and generated a partial cDNA sequence of 542 pb. Blast analysis confirmed that the fragment was a part of an *abcg2*-like gene sequence.

The 2198 pb full length cDNA sequence was secondarily obtained by assembling of various sequences from RACE and PCR reactions performed on different cDNAs (Genbank accession number KX551963). It contained a 1926 pb ORF encoding a 641 amino acid polypeptide. In addition, 265 pb and 6 pb of 5'-and 3'-UTR were identified. The deduced amino acid sequence has a calculated molecular mass of 71.5 kDa and a theoretical isoelectric point of 7.57.

Analyses of amino acid sequence revealed the structural organization of ABCG2 transporter in a single subunit with a nucleotide binding domain (NBD) and a membrane spanning domain (MSD). The NBD contained highly conserved motifs of ABC transporters: the walker A/P-loop, walker B, ABC signature (C motif) as well as the Q-loop/lid upstream of the walker A and the D-loop and H-loop/switch regions downstream of the walker B (**Figure 1-2**). Furthermore, the MSD was organized in six putative transmembrane helices and the NH2 terminal was located in the cytosol. Two possible N-glycosylation sites (Asn-Val-Ser) were identified respectively in the 2nd-3rd (amino acid 454-456) and the 5th-6th (amino acid 552-554) transmembrane helice. No signal peptide was detected (**Figure 1-2**).

The phylogenetic analysis revealed the similarity of *M. edulis* ABCG2 with other representative ABCG2 protein from different species (**Figure 3**). *M. edulis* amino acid sequence matched the most with *Mytilus galloprovincialis* (98%), *Crassostrea gigas* (65%) and *Lottia gigantea* ABCG2 (64%) while identities with other vertebrates and invertebrates orthologs were comprised between 49% and 61% (49% with human protein).

3.2. ABCG2 transcript levels in hemocytes and gills

The expression of *abcg2*-like mRNAs was investigated in *Mytilus edulis* hemocytes and gills (**Figure 4**). Transcript levels were normalized to *ef1a*. This housekeeping gene was stable amongst tissues (data not shown). Both tissues showed the presence of *abcg2*-like gene product. Furthermore, transcripts were significantly more abundant in gills (2.5 times) than in hemocytes.

3.3. ABCG2 transporter activity

BCRP efflux activity was investigated in hemocyte suspensions and gill tissues using bodipy prazosin (Cooray et al., 2004) and pheophorbide A (Robey et al., 2004) as ABCG2 pump allocrites. Cells were treated with pharmacological blockers characterized by their specificity for human ABC transporters (Table 1).

3.3.1. In hemocytes

BCRP efflux activity was explored in hemocyte subpopulations by flow cytometry. Cell fluorescence was analysed according criteria of cell size (EV expressed in μm) and inner complexity (side-scatter signal). Two non-overlapping regions were defined on EV/SS dot plots. The region R1 corresponds to small semi-granular basophils and the region R2 to large granular and semi-granular cells called eosinophils (Figure 5a). The normalized intracellular fluorescence concentration (FL-FC, arbitrary units) was calculated from the ratio of FL to EV (Figure 5b).

The cell fluorescence varied according to the probe used. Bodipy prazosin was more accumulated in eosinophils. In contrary, pheophorbide A was slightly more concentrated in basophils. In the presence of ABC transporter inhibitors sildenafil, MK571, Ko 134 and elacridar, bodipy prazosin accumulation increased significantly in hemocytes particularly in eosinophils, while pranlukast had no effect on dye efflux (Figure 5c). By contrast, pheophorbide A efflux was only non significantly inhibited by all blockers, at different levels.

To compare blockers effects on pump activity, the multidrug resistance activity factor was determined (Table 3). Cells charged with bodipy prazosin showed an increased MAF for most inhibitors (sildenafil, MK571, Ko 134, elacridar) compared to hemocytes incubated with pheophorbide A. Furthermore, with bodipy prazosin no differences were noted between hemocyte subpopulations. By contrast, MAF values were less important in basophils loaded with pheophorbide A than in eosinophils.

3.3.2. In gills

ABCG2 pump activity was explored in gills with a microplate reader assay. Only MK571 and Ko 134 significantly increased bodipy prazosin accumulation, indicating an inhibition of the dye efflux (Figure 6a). The other blockers induced a slight but non-significant increase in cell fluorescence. With the probe pheophorbide A, slight fluorescence increases were obtained mainly in gills pre-incubated with sildenafil or Ko 134, but no inhibitor produced result significantly different from control measurements. Furthermore, in control conditions, both BCRP allocrites were more effluxed from the anterior-labial part of gills (Figure 6b). In the presence of pump

blockers (MK571 and Ko 134), fluorescence increased and was more concentrated in the center and anterior side of the tissues.

Gills charged with bodipy prazosin showed higher MAF values compared to pheophorbide A. in the presence of Ko 134, efflux activity was more important for both fluorescent probes (**Table 4**). However, MK571 showed a high MAF value only for bodipy prazosin.

4. Discussion

ABC transporters play an important role in cell detoxification. Until now, only B and C subfamilies were identified in the blue mussel. In this study, we expand the knowledge on ABC pump subtypes and investigate the presence of ABCG2 in *Mytilus edulis* tissues. To this purpose, we combined molecular and functional approaches to explore gene expression and pump activity in the gills and hemocytes.

4.1. ABCG2 molecular characterization

ABCG2 amino acid sequence was identified from the gills of *Mytilus edulis* and characterized. It contained typical conserved structural domains of ABC transporter. Characteristic motifs including the Walker A and B motifs are common to many ATP binding proteins while aromatic D, H and Q loops as well as ABC signature are unique to the family (Dean et al., 2001; Linton, 2007). They play an important role in the functioning of the transporter (Linton, 2007). According to the predicted structure, *Mytilus edulis* ABCG2 is a half transporter, with one NBD followed by one MSD and a molecular weight equal to 71.5 KDa which is closely similar to human ABCG2 (Kathawala et al., 2015).

Phylogenetic analysis grouped the identified protein with other ABCG2 members from several species. *Mytilus edulis* ABCG2 was closely related to invertebrate transporters especially *Mytilus galloprovincialis* and *Crassostrea gigas* efflux pumps. This classification is not surprising considering that ABC transporters are well conserved across species. Most of the studies reported a strong homology between bivalve ABC pumps. For example, Huang et al. (2015) identified P-gp in the bivalve species *R. philippinarum*, *S. subcrenata* and *T. granosa* exhibiting high homology with other bivalve mollusks such as *C. ariakensis*, *C. gigas*, *M. californianus* and *M. galloprovincialis*.

Since ABCG2 transcript has also been found in hemocytes, we quantified the abundance mRNAs in both tissues. ABCG2 copy number were 2 fold higher in gills than hemocytes. This apparent disparity in gene expression over tissues has been demonstrated for other members of ABC transporters. P-gp transcripts were more abundant in gills than hemocytes in the scallop *C. farreri*

(Miao et al., 2014) and the mussel *M. galloprovincialis* (Della Torre et al., 2014; Franzellitti et al., 2016). Many authors suggested that the tissue-specific expression of ABC genes is a consequence of tissue involvement in adsorption, metabolism and elimination of toxic compounds (Della Torre et al., 2014; Huang et al., 2015). The latter hypothesis may be plausible nevertheless further investigations are needed to confirm it.

4.2. ABCG2 pump efflux activity

If ABCG2 expression has been poorly described in bivalves, data on pump activity are inexistent. Herein, we explored for the first time BCRP pump activity using fluorescent probes, allocrite to human BCRP, in combination with a battery of inhibitors. In hemocytes, analysis was performed considering two major subpopulations. The first is represented by small semi granular basophils while the second includes complex granulocytes and agranular hyalinocytes (Le Foll et al., 2010). Results showed that the rate of accumulated fluorescence varied according to both cell subtypes and allocrite probes. Either in basal condition or in the presence of blockers, bodipy prazosin was more concentrated in eosinophils and inversely pheophorbide A was more stored in basophils. In appearance, these probe heterogeneous distributions may be a consequence of pronounced activity localized in particular cell subpopulation as reported by other studies. In this respect, Rioult et al. (2014) demonstrated that ABCC activity was supported by *Mytilus edulis* granulocytes. However, herein even though probes are supposed to be both allocrite to ABCG2 (Robey et al., 2004; Shi et al., 2011), their distribution profiles in hemocytes were contradictory. These discrepancies can be accounted for by to a dual effect of transporter location and differential affinity of substrates to cell compartments. According to few studies, ABC pumps can be located in mammalian lysosomal membrane in addition of plasmalemma (Rajagopal and Simon, 2003; Wioland et al., 2000). Furthermore, in mussel blood cells, it has been shown a retention of the fluorescent P-gp substrate rhodamine B in lysosomes, reversible by verapamil as blocker (Svensson et al., 2003). Another explanation to the higher accumulation of bodipy prazosin in eosinophils would be the presence of an additional pump contributing to the observed activity. Actually, if pheophorbide A has been proved to be a single substrate to mammalian ABCG2 (Robey et al., 2004), the specificity of bodipy prazosin was more discussed. Several studies reported the efflux of bodipy prazosin by Human P-gp (Chufan et al., 2013; Kimchi-Sarfaty et al., 2002). In mussel hemocytes, the existence of an active P-gp is controversial. Classical ABCB blockers were ineffective on calcein-AM or rhodamine 123 efflux in hemocytes of *M. edulis* (Rioult et al., 2014) and *M. galloprovincialis* (Della Torre et al., 2014; Franzellitti et al., 2016). In contrast, rhodamine B efflux was inhibited by the same blockers in blood cells of the blue mussel (Svensson et al., 2003) and the freshwater

painter's mussel (Zaja et al., 2006). According to these contradictory findings, the possibility of an ABCB pump interference in MXR activity cannot be excluded. It is probable that the mussel P-gp has an affinity profiles toward allocrites that differs from that of mammalian transporter and that the mussel efflux pump is capable to interact with other substrates like bodipy prazosin. Considering this latter point, a combination of allocrites and inhibitors is required to properly characterize the pump of interest.

In hemocytes, the specific blockers of mammalian BCRP, elacridar and Ko 134, enhanced fluorescence level of both probes indicating an active role of ABCG2 in cell subpopulations. By contrast, sildenafil acted only on bodipy prazosin efflux and had no effect on pheophorbide A. This blocker has been described for reversing the resistance of ABCG2 and ABCB1 in Human cells (Shi et al., 2011). Surprisingly, classical inhibitors of C class transporter increased also the accumulation of fluorescent dyes. MK571 blocked the efflux of both probes while pranlukast had an effect only on pheophorbide A. Several studies used MK571 for his specific action against ABCC pump in bivalves like the blue mussel (Rioullet et al., 2014), the Mediterranean mussel (Della Torre et al., 2014; Franzellitti et al., 2016), the Californian mussel (Luckenbach et al., 2008; Luckenbach and Epel, 2008) and the zebra mussel (Faria et al., 2016, 2011). However, in our study, it seems that this blocker is also able to interact with ABCG2 in mussels. Furthermore, Fischer et al. (2013) reported its action on zebrafish ABCB4. Thus, regarding this polyspecificity, results should be interpreted more carefully particularly when the tissue expresses multiple transporters.

In gills, dye accumulation was enhanced at different levels after treatment with blockers indicating a BCRP activity. Ko 134 inhibited efficiently the efflux of bodipy prazosin ($MAF=29\pm6.4$) and pheophorbide A ($MAF=28\pm7.1$), whereas, MK571 blocked more bodipy prazosin ($MAF=38\pm8.1$). The difference of substrate inhibition profiles compared to hemocytes may be due to the heterogeneous distribution of the transporter in gills. Indeed, BCRP efflux activity seems to be concentrated in the anterior side of gills suggesting a localized expression of ABCG2. ABC transporter localization has been explored in few studies. BCRP was found in apical border of mammalian tissues, (Leslie et al., 2005) and *Saccostrea forskali* gills (Kingtong et al., 2007). Similarly, P-gp was detected in apical membranes of *Mytilus galloprovincialis* gills at the tissue environment interface and authors suggested his role as a barrier against entrance of xenobiotics (Luckenbach and Epel, 2008).

5. Conclusion

In this study, we identified and characterized a new ABC transporter belonging to G2 subtype in *Mytilus edulis*. Phylogenetic analysis revealed a sequence homology and a similar organizational structure than other ABCG2 family members. Furthermore, transcripts were expressed in hemocytes and with higher level in gills. Efflux activity assays show that *Mytilus edulis* has an active BCRP protein with an heterogeneous distribution in hemocyte subpopulations and gill tissues. Based on these results, it is clear that several ABC transporters contribute to MXR defense system in *Mytilus edulis*. Efforts have to be made to clarify the distinction between the different members and to explore their single function and specificity towards allocrites and chemosensitizers.

Acknowledgements

This work received fundings from the State/Region Plan Contract (CPER) allocated through the Research Federation FR CNRS 3730 SCALE (Sciences Appliquées à L'Environnement) and from the project IPOC supported by the Agence Nationale de la Recherche “Interactions between POLLution and Climate changes: development of improved monitoring strategy” project (ANR-12-ISV7-0004). Yosra Ben Cheikh was a recipient for a Ph.D. grant from the Conseil Regional de Haute-Normandie. We thanks SEBIO technical staff Aurélie Duflot for her contribution.

References

- Akaishi, F.M., St-Jean, S.D., Bishay, F., Clarke, J., da S Rabitto, I., de Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 82, 1–14. doi:10.1016/j.aquatox.2007.01.008
- Anita H Poulsen, E.B.I., 2012. Chemically induced immunosuppression and disease susceptibility in marine wildlife: a literature review.
- Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D., Duchemin, M., 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 393–405. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.10.016
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389. doi:10.1016/S0166-445X(00)00088-6
- Chen, H., Zha, J., Yuan, L., Wang, Z., 2015. Effects of fluoxetine on behavior, antioxidant enzyme systems, and multixenobiotic resistance in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Chemosphere* 119, 856–862. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.08.062
- Chufan, E.E., Kapoor, K., Sim, H.-M., Singh, S., Talele, T.T., Durell, S.R., Ambudkar, S.V., 2013. Multiple transport-active binding sites are available for a single substrate on human P-glycoprotein (ABCB1). *PLOS ONE* 8, e82463. doi:10.1371/journal.pone.0082463
- Cooray, H.C., Janvilisri, T., van Veen, H.W., Hladky, S.B., Barrand, M.A., 2004. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 269–275. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.040
- Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R., 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11, 1156–1166. doi:10.1101/gr.184901
- Della Torre, C., Bocci, E., Focardi, S.E., Corsi, I., 2014. Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Mar. Environ. Res.* 93, 56–63. doi:10.1016/j.marenvres.2013.06.005
- Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C.N., Macmanus-Spencer, L.A., Hamdoun, A., Smital, T., 2008. Efflux transporters: Newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3914–3920.
- Faria, M., Navarro, A., Luckenbach, T., Piña, B., Barata, C., 2011. Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 101, 78–87. doi:10.1016/j.aquatox.2010.09.004
- Faria, M., Pavlichenko, V., Burkhardt-Medicke, K., Soares, A.M.V.M., Altenburger, R., Barata, C., Luckenbach, T., 2016. Use of a combined effect model approach for discriminating between ABCB1- and ABCC1-type efflux activities in native bivalve gill tissue. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 297, 56–67. doi:10.1016/j.taap.2016.02.020

- Farris, J.L., Hassel, J.H.V., 2006. Freshwater Bivalve Ecotoxicology. CRC Press.
- Fischer, S., Klüver, N., Burkhardt-Medicke, K., Pietsch, M., Schmidt, A.-M., Wellner, P., Schirmer, K., Luckenbach, T., 2013. Abcb4 acts as multixenobiotic transporter and active barrier against chemical uptake in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. BMC Biol. 11, 69. doi:10.1186/1741-7007-11-69
- Franzellitti, S., Striano, T., Valbonesi, P., Fabbri, E., 2016. Insights into the regulation of the MXR response in haemocytes of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). Fish Shellfish Immunol. 58, 349–358. doi:10.1016/j.fsi.2016.09.048
- Giarratano, E., Duarte, C.A., Amin, O.A., 2010. Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 270–279. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.10.009
- Gottesman, M.M., Ling, V., 2006. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. FEBS Lett. 580, 998–1009. doi:10.1016/j.febslet.2005.12.060
- Gupta, S.K., Singh, J., 2011. Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: A review. IIOAB J. 2, 49–57.
- Haberkorn, H., Tran, D., Massabuau, J.-C., Ciret, P., Savar, V., Soudant, P., 2011. Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium minutum*. Mar. Pollut. Bull. 62, 1191–1197. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.03.034
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Shumway, S.E., 2007. Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusc when exposed to three species of harmful algae. J. Shellfish Res. 26, 549–559. doi:10.2983/0730-8000(2007)26[549:DFROFS]2.0.CO;2
- Huang, L., Liu, S.-L., Zheng, J.-W., Li, H.-Y., Liu, J.-S., Yang, W.-D., 2015. P-glycoprotein and its inducible expression in three bivalve species after exposure to *Prorocentrum lima*. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 169, 123–132. doi:10.1016/j.aquatox.2015.10.012
- Huang, L., Wang, J., Chen, W.-C., Li, H.-Y., Liu, J.-S., Jiang, T., Yang, W.-D., 2014. P-glycoprotein expression in *Perna viridis* after exposure to *Prorocentrum lima*, a dinoflagellate producing DSP toxins. Fish Shellfish Immunol. 39, 254–262. doi:10.1016/j.fsi.2014.04.020
- Kathawala, R.J., Gupta, P., Ashby, C.R., Chen, Z.-S., 2015. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother. 18, 1–17. doi:10.1016/j.drug.2014.11.002
- Kimchi-Sarfaty, C., Gripar, J.J., Gottesman, M.M., 2002. Functional characterization of coding polymorphisms in the Human MDR1 gene using a vaccinia virus expression system. Mol. Pharmacol. 62, 1–6. doi:10.1124/mol.62.1.1
- Kingtong, S., Chitramvong, Y., Janvilisri, T., 2007. ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. Aquat. Toxicol. 85, 124–132. doi:10.1016/j.aquatox.2007.08.006

- Köhler, A., Lauritzen, B., Jansen, D., Böttcher, P., Teguliwa, L., Krüner, G., Broeg, K., 1998. Detection of P-glycoprotein mediated MDR/MXR in *Caranus maenas* hepatopancreas by immuno-gold-silver labeling. Mar. Environ. Res., Pollutant Responses in Marine Organisms 46, 411–414. doi:10.1016/S0141-1136(97)00069-X
- Kurelec, B., 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. Crit. Rev. Toxicol. 22, 23–43. doi:10.3109/10408449209145320
- Kurelec, B., Krca, S., Pivcevic, B., Ugarković, D., Bachmann, M., Imsiecke, G., Müller, W.E., 1992. Expression of P-glycoprotein gene in marine sponges. Identification and characterization of the 125 kDa drug-binding glycoprotein. Carcinogenesis 13, 69–76.
- Kurelec, B., Pivcević, B., 1989. Distinct glutathione-dependent enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a fresh-water mussel *Anodonta cygnea*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 164, 934–940.
- Le Foll, F., Rioult, D., Boussa, S., Pasquier, J., Dagher, Z., Leboulenger, F., 2010. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. Fish Shellfish Immunol. 28, 372–386. doi:10.1016/j.fsi.2009.11.011
- Lebedeva, I.V., Pande, P., Patton, W.F., 2011. Sensitive and specific fluorescent probes for functional analysis of the three major types of mammalian ABC transporters. PLoS ONE 6, e22429. doi:10.1371/journal.pone.0022429
- Lepist, E.-I., Phan, T.K., Roy, A., Tong, L., MacLennan, K., Murray, B., Ray, A.S., 2012. Cobicistat boosts the intestinal absorption of transport substrates, including HIV protease inhibitors and GS-7340, *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 5409–5413. doi:10.1128/AAC.01089-12
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. Toxicol. Appl. Pharmacol. 204, 216–237. doi:10.1016/j.taap.2004.10.012
- Linton, K.J., 2007. Structure and Function of ABC Transporters. Physiology 22, 122–130. doi:10.1152/physiol.00046.2006
- Luckenbach, T., Altenburger, R., Epel, D., 2008. Teasing apart activities of different types of ABC efflux pumps in bivalve gills using the concepts of independent action and concentration addition. Mar. Environ. Res. 66, 75–76. doi:10.1016/j.marenvres.2008.02.027
- Luckenbach, T., Epel, D., 2008. ABCB- and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 294, R1919–R1929. doi:10.1152/ajpregu.00563.2007
- Luedeking, A., Koehler, A., 2002. Identification of six mRNA sequences of genes to multixenobiotic resistance (MXR) and biotransformation in *Mytilus edulis*. Mar. Ecol.-Prog. Ser. - MAR ECOL-PROGR SER 238, 115–124. doi:10.3354/meps238115
- Luedeking, A., Van Noorden Cornelis J. F., Koehler A., 2005. Identification and characterisation of a multidrug resistance-related protein mRNA in the blue mussel *Mytilus edulis*. - MAR ECOL-PROGR SER. 2005, vol. 286, pp. 167-175

- McFadzen, I., Eufemia, N., Heath, C., Epel, D., Moore, M., Lowe, D., 2000. Multidrug resistance in the embryos and larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* 50, 319–323.
- Miao, J., Cai, Y., Pan, L., Li, Z., 2014. Molecular cloning and characterization of a MXR-related P-glycoprotein cDNA in scallop *Chlamys farreri*: transcriptional response to benzo(a)pyrene, tetrabromobisphenol A and endosulfan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 110, 136–142. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.08.029
- Minier, C., Forget-Leray, J., Bjørnstad, A., Camus, L., 2008. Multixenobiotic resistance, acetylcholine esterase activity and total oxyradical scavenging capacity of the Arctic spider crab, *Hyas araneus*, following exposure to bisphenol A, tetra bromo diphenyl ether and diallyl phthalate. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1410–1415. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.05.005
- Nagayama, S., Chen, Z.S., Kitazono, M., Takebayashi, Y., Niwa, K., Yamada, K., Tani, A., Haraguchi, M., Sumizawa, T., Furukawa, T., Aikou, T., Akiyama, S., 1998. Increased sensitivity to vincristine of MDR cells by the leukotriene D4 receptor antagonist, ONO-1078. *Cancer Lett.* 130, 175–182.
- Navarro, A., Weißbach, S., Faria, M., Barata, C., Piña, B., Luckenbach, T., 2012. Abcb and Abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 122–123, 144–152. doi:10.1016/j.aquatox.2012.06.008
- Nielsen, D., Skovsgaard, T., 1992. P-glycoprotein as multidrug transporter: a critical review of current multidrug resistant cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1139, 169–183.
- Olson, D.P., Taylor, B.J., Ivy, S.P., 2001. Detection of MRP functional activity: calcein AM but not BCECF AM as a Multidrug Resistance-related Protein (MRP1) substrate. *Cytometry* 46, 105–113.
- Rajagopal, A., Simon, S.M., 2003. Subcellular localization and activity of Multidrug Resistance Proteins. *Mol. Biol. Cell* 14, 3389–3399. doi:10.1091/mbc.E02-11-0704
- Riout, D., Pasquier, J., Boulangé-Lecomte, C., Poret, A., Abbas, I., Marin, M., Minier, C., Le Foll, F., 2014. The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 153, 98–109. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.012
- Robey, R.W., Steadman, K., Polgar, O., Morisaki, K., Blayney, M., Mistry, P., Bates, S.E., 2004. Pheophorbide A is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res.* 64, 1242–1246.
- Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., Váradi, A., 2006. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnate defense system. *Physiol. Rev.* 86, 1179–1236. doi:10.1152/physrev.00037.2005
- Sato, H., Siddig, S., Uzu, M., Suzuki, S., Nomura, Y., Kashiba, T., Gushimiyagi, K., Sekine, Y., Uehara, T., Arano, Y., Yamaura, K., Ueno, K., 2015. Elacridar enhances the cytotoxic effects of sunitinib and prevents multidrug resistance in renal carcinoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 746, 258–266. doi:10.1016/j.ejphar.2014.11.021

- Sharom, F.J., 2008. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 9, 105–127. doi:10.2217/14622416.9.1.105
- Shi, Z., Tiwari, A.K., Shukla, S., Robey, R.W., Singh, S., Kim, I.-W., Bates, S.E., Peng, X., Abraham, I., Ambudkar, S.V., Talele, T.T., Fu, L.-W., Chen, Z.-S., 2011. Sildenafil reverses ABCB1- and ABCG2-mediated chemotherapeutic drug resistance. *Cancer Res.* 71, 3029–3041. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3820
- Svensson, S., Särngren, A., Förlin, L., 2003. Mussel blood cells, resistant to the cytotoxic effects of okadaic acid, do not express cell membrane p-glycoprotein activity (multixenobiotic resistance). *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 65, 27–37.
- Toomey, B.H., Epel, D., 1993. Multixenobiotic Resistance in *Urechis caupo* Embryos: Protection From Environmental Toxins. *Biol. Bull.* 185, 355–364.
- Wioland, M.A., Fleury-Feith, J., Corlieu, P., Commo, F., Monceaux, G., Lacau-St-Guily, J., Bernaudin, J.F., 2000. CFTR, MDR1, and MRP1 immunolocalization in normal human nasal respiratory mucosa. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 48, 1215–1222.
- Xuereb, B., Forget-Leray, J., Souissi, S., Glippa, O., Devreker, D., Lesueur, T., Marie, S., Danger, J.-M., Boulangé-Lecomte, C., 2012. Molecular characterization and mRNA expression of grp78 and hsp90A in the estuarine copepod *Eurytemora affinis*. *Cell Stress Chaperones*. doi:10.1007/s12192-012-0323-9
- Zaja, R., Klobucar, G.I.V., Sauerborn Klobucar, R., Hackenberger, B.K., Smital, T., 2006. Haemolymph as compartment for efficient and non-destructive determination of P-glycoprotein (Pgp) mediated MXR activity in bivalves. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* 143, 103–112. doi:10.1016/j.cbpc.2005.12.009

Figure legend

Figure 1. Topology of the *Mytilus edulis* ABCG2 protein with membrane spanning domains (MSD) as predicted by TMHMM v2.0 and nucleotide binding domain (NBD) indicated by the Walkers A and B, the C motif, the Q-, D- and H-loops. GS marks the N-glycosylation sites.

Figure 2. ClustalW alignments of *Mytilus edulis* ABCG2 with Human ABCG2 transporter (GenBank accession no. Q9UNQ0). Conserved Walker A and B motifs, the ABC signature C motif, Q-, D- and H-loops are indicated with coloured boxes. Underlined sections represent transmembrane helices according to the TMHMM program. GS marks the N-glycosylation sites.

* indicate similar amino acid

Figure 3. Phylogenetic tree based on multiple alignment (ClustalX) of various ABCG2 transporter subtype sequences from diverse vertebrates and invertebrates. Tree was generated using the neighbour-joining method, distances are shown at the nodes.

Figure 4. Relative expression of *abcg2*-like in *Mytilus edulis* hemocytes and gills. Transcript levels are normalized to *ef1α* (hk gene). Letters indicate significant differences (mean $\pm$ SEM, n=5, $p < 0.01$, Student's t-test).

Figure 5. Flow cytometry analysis of BCRP efflux activity in hemocyte subpopulations. Cells were preincubated for 30 min with various blockers at 30 μ M and then a fluorescent dye, bodipy prazosin (0.5 μ M) or pheophorbide A (5 μ M), was loaded for 15 min. **a**, dot plot of cell Coulter-type electronic volume (EV), graphed versus cell complexity side-scatter (SS). Two subpopulations of interest have been delimited by off-line analysis and considered to correspond to basophils and eosinophils. **b**, normalized fluorescence (FL1-FC, for FL1-fluorescence concentration) distributions of the sample presented in **a**, expressed as the ratio of FL1 to cell size. **c**, mean fluorescence of hemocytes in absence or presence of blockers, for respective fluorescent dyes (bars are SEM, n=3-5). * indicates significant differences from the control (Student's t-test, $*p < 0.05$) and § marks differences between hemocyte subpopulations (Student's t-test, §§ $p < 0.01$)

Figure 6. BCRP efflux activity in gills measured by dye accumulation in presence of ABC transporter inhibitors. Cells were preincubated for 30 min with various blockers at 30 μ M and then a fluorescent dye, bodipy prazosin (0.5 μ M) or pheophorbide A (5 μ M), was loaded for 15 min. **a**, mean of fluorescence of gills in absence or presence of blockers and, for respective fluorescent dyes (bars are SEM, n=4, $*p < 0.05$ Student's t-test). **b**, colour-coded cartography of probes accumulation in gills in control and blocked samples (P: posterior, A:anterior, DS: Dorsal side, VS: Ventral side)

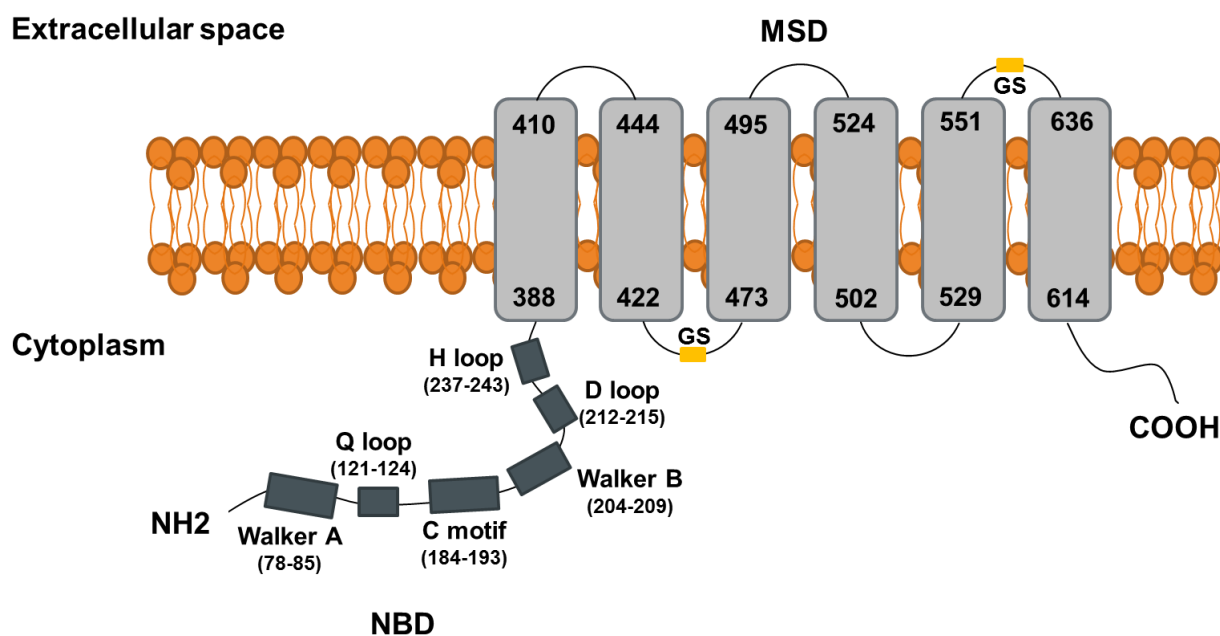


Figure 1. Topology of the *Mytilus edulis* ABCG2 protein

```

Mussel ABCG2 MSKTN-GVPNPAYNYGSKDEHSKVDMESSHYERAATITGHNIVYTVDVKT--KPCCGQIE 57
Human ABCG2 **SS*VE*FI*VSQGNTNGFPATASNDLKAFTEG*VLSF***C*R*KL*SGFL**RKPV* 60

                                Walker A
Mussel ABCG2 KKEILKGINGIFKPGMNAILGPTGSGKSSVLDILAGRKDPAGLSGHLLLDGSPPPENFKC 117
Human ABCG2 *-***SN***M***L***L***C***L**V**A***S***DV*IN*A*R*A*** 119
                                Q-loop

Mussel ABCG2 MVGYYVQDDVVMGGLTVRENFEFSATLRLPSDVTKADRKDRVDNVINELGLNKCADTKVG 177
Human ABCG2 NS*****T*****LQ***A***ATTM*NHEKNE*INR**Q****D*V***S*** 179
                                C motif                                Walker B                                D-loop

Mussel ABCG2 NEFFRGVSGGERKRTNIGMELIISPPVLFLEPTTGLDANTANSVMMLLRLALKGRTVV 237
Human ABCG2 TQ*I*****S*****TD*ST*****SS**A*LL**K*MSKQ***IT 239
                                H-loop

Mussel ABCG2 FSIHQPRYSIFKLFDSLMLLSMGECVYHGPASESLEYFKSIGYVIEEHNPNPDDFFLDVIN 297
Human ABCG2 *****T**AS*RLMF***Q*A*G**E*A*HC*AY**A*****I** 299

Mussel ABCG2 GEAN---HSEKDINEISVKDIEEVHTKLVSSFQKSTLNSRLQNQMNPILQQYQHAVETN 353
Human ABCG2 *DSTAVALNR*E*FKATEIIEPSKQDKP*IEKLAEIYV**SFYKETKAE*H*LSGGEKKK 359

Mussel ABCG2 TVKVLPKIEYATSAFTQFRAVSGRTILNLLRNPQLSVMQWLVLIIIFGLIVGAIYWQLEKD 413
Human ABCG2 KIT*FKE*S*T**FCH*L*W**K*SFK***G***A*IA*II*TVVL**VI***FG*KN* 419
                                GS

Mussel ABCG2 CVTGIQNRVGAFFFIIMNQVFGNLSAVELFIKERSIFMHNVSFGFYRVSAFFFSKIICDV 473
Human ABCG2 S-*****A*VL**LTT**C*SSV*****VV*KKL*I**YI**Y*****S**LG*LLS*L 478

Mussel ABCG2 IPMRLIPVILFSAVTYFMLGLRLAAENFFLYVLSLFLVAMSASGIAFFFSATVSIFAVAN 533
Human ABCG2 L***ML*S*I*TCIV*****KPK*DA**VMMFT*MM**Y***SM*LAIA*GQ*VVS**T 538
                                GS

Mussel ABCG2 LCIALTYVFMVFSGLLVNVSSVPSWLRLKWLKASLFRYGLNALDINELKDMTFSN----- 588
Human ABCG2 *LMTICF****I*****LTIA***S**QYF*IP***FT**QH**FLGQN*CPGLNAT 598
                                GS

Mussel ABCG2 GTATC---SATGNDYLIDQNIPIQTSWDFWQNIVALGAMSVISMTGTIYIQLRRMKK-- 641
Human ABCG2 *NNP*NYATC**EE**VK*G*DLSP-*GL*K*H***AC*I**FL*IA*LK*LFL**YS 655

```

Figure 2. ClustalW alignments of *Mytilus edulis* ABCG2 with human ABCG2 transporter

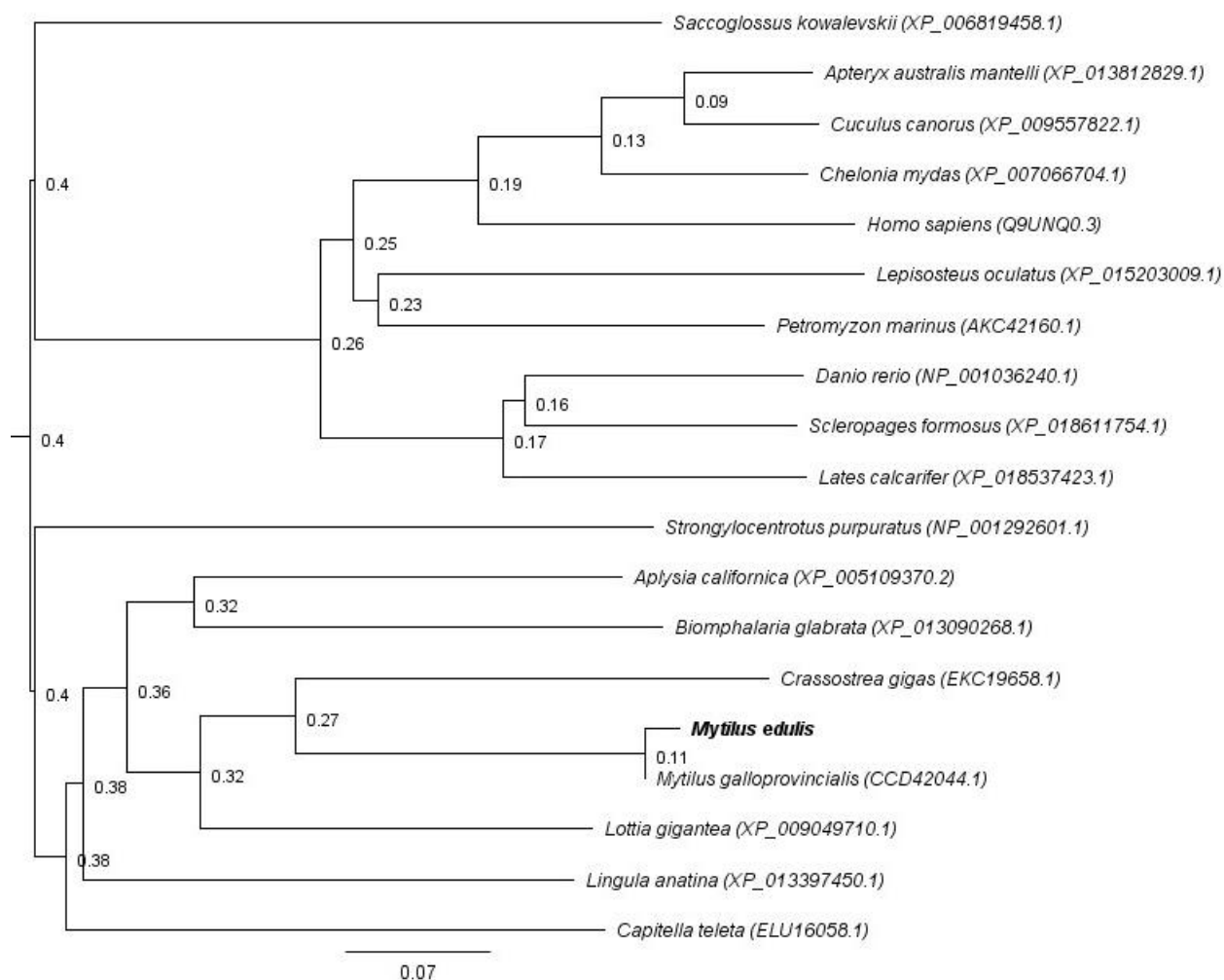


Figure 3. Phylogenetic tree based on multiple alignment (ClustalX) of various ABCG2 transporter subtype sequences from diverse vertebrates and invertebrates

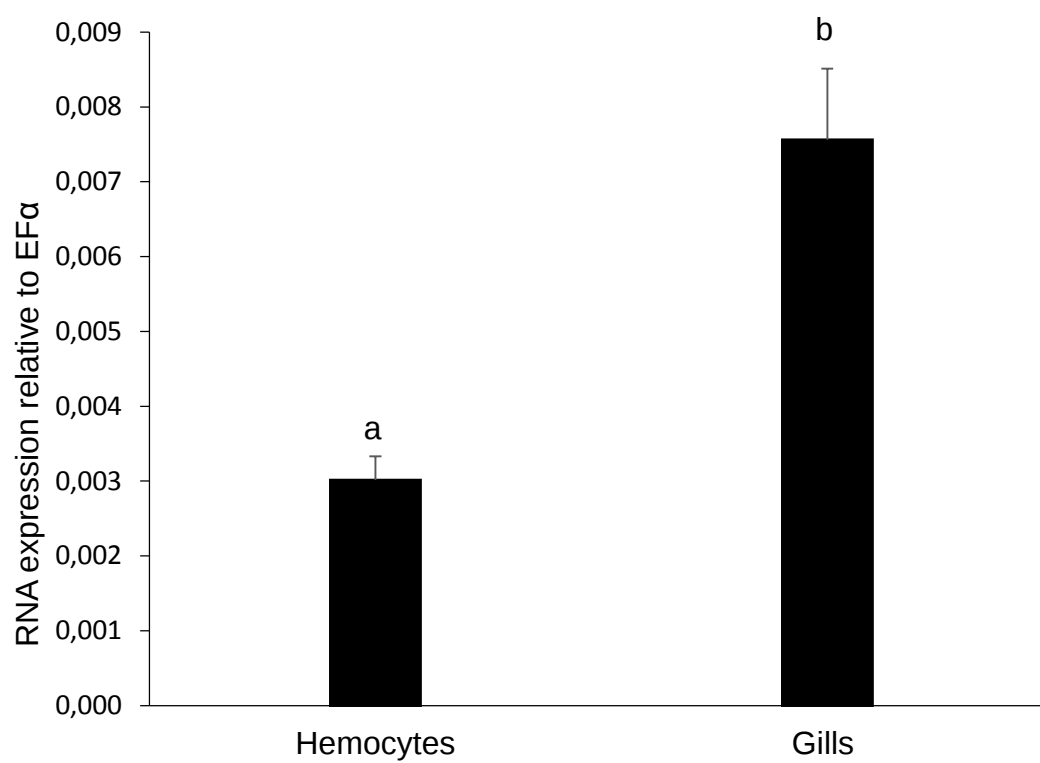


Figure 4. Relative expression of *abcg2*-like in *Mytilus edulis* hemocytes and gills

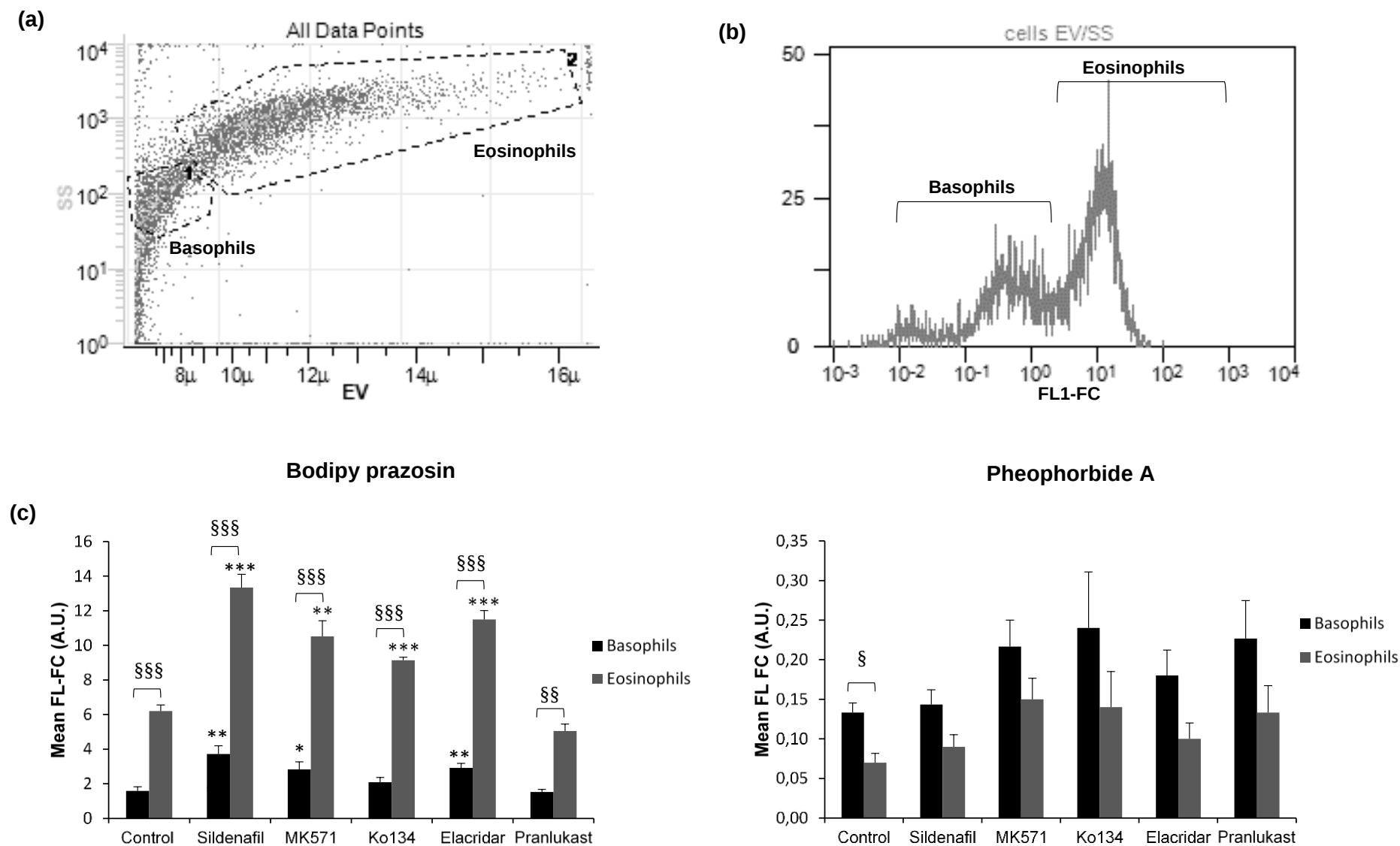


Figure 5. Flow cytometry analysis of BCRP efflux activity in hemocyte subpopulations

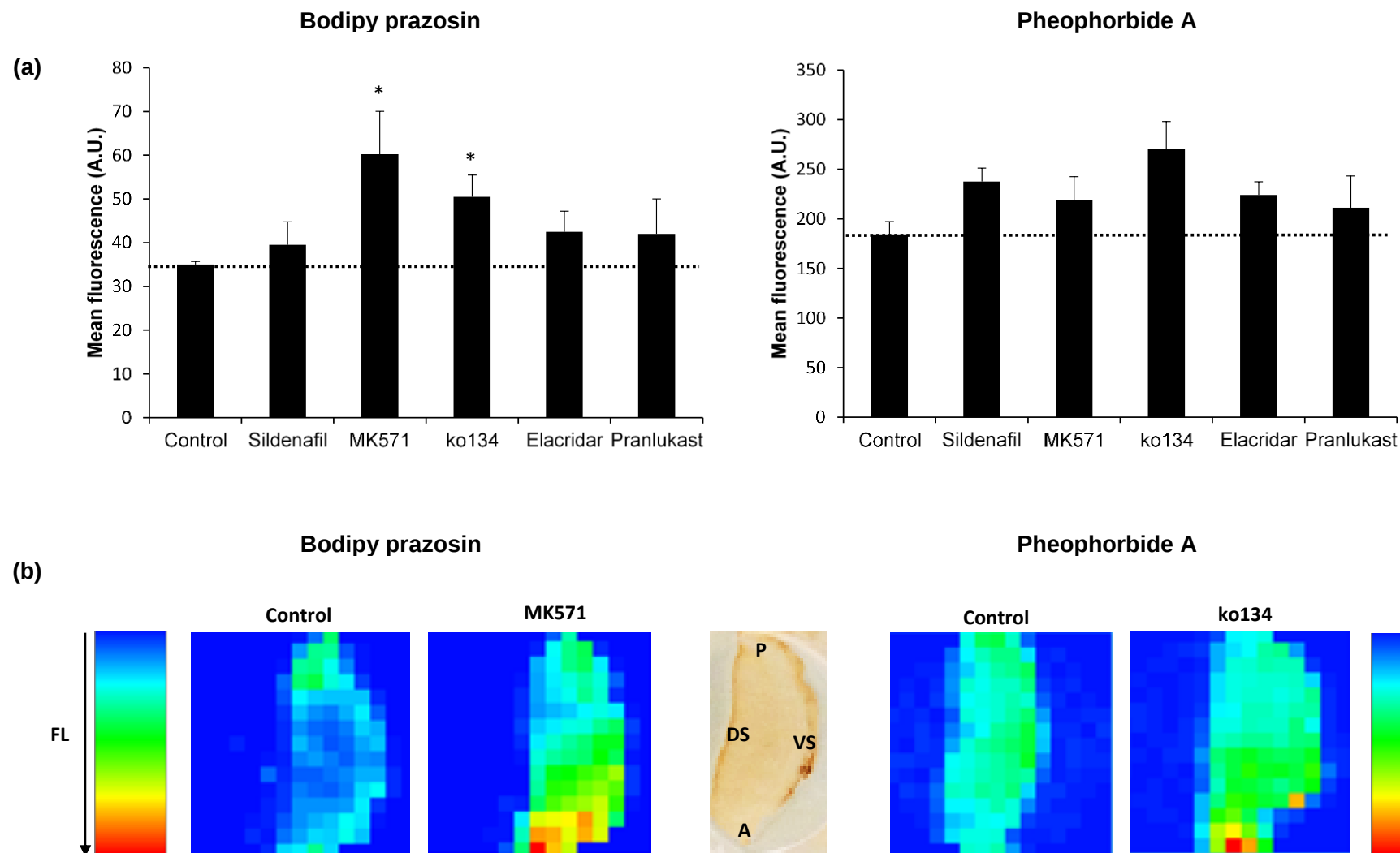


Figure 6. BCRP efflux activity in gills measured by dye accumulation in presence of ABC transporter inhibitors

Tables:**Table 1.** Specificity of ABC blockers used in this study

Chemicals	Blocker specificity	Reference
Sildenafil	ABCB/ABCG2	Shi et al., 2011
MK571	ABCC	Olson et al., 2001
Pranlukast (ONO-1078)	ABCC	Nagayama et al., 1998
Ko134	ABCG2	Lepist et al., 2012
Elacridar	ABCG2	Sato et al., 2015

Table 2. Primers used in this study

Gene	Accession number	Fw 5'-3'	Rev 5'-3'	Tm (°C)	Amplicon size (pb)	Reaction
<i>abcg2</i>	gi 406717747	CCCTGCTGGTTTAAGTGGAC	ATCAACACCAACCACTGCAT	59	879	PCR
	KX551963	GCGAGATGGACAAACGAACC	ATGGATTGGTCCTTGCACT	60	2248	PCR
	KX551963	TGGTGGGCTATGTTGTTTCAGGATGA	CTTTCTCCACCAGATACACCACGGA	64	214	RACE PCR
	KX551963	TGTGCTATTTTATAGATGAACCAACA	TCCTTCCTTTTAATGCTAATCTTCTC	59	95	qPCR
<i>efla</i>	AF063420.1	TGTGCTATTTTATAGATGAACCAACA	TCCTTCCTTTTAATGCTAATCTTCTC	59	61	qPCR

Table 3. Comparison of BCRP activity detection in hemocyte subpopulations using BCRP probes and inhibitors of different specificity

BCRP Probe	Hemocyte subpopulation	Sildenafil	MK571	Ko134	Elacridar	Pranlukast
Bodipy prazosin	Basophils	55 ± 6.9	38 ± 11.7	25 ± 9.9	44 ± 5.3	0
	Eosinophils	53 ± 2.5	39 ± 5.6	32 ± 1.3	46 ± 2.5	0
Pheophorbide A	Basophils	9 ± 8.6	35 ± 11.9	35 ± 15.8	21 ± 13.6	36 ± 12.1
	Eosinophils	18 ± 12.3	50 ± 8.3	41 ± 14.7	25 ± 12.5	41 ± 12.6

Average MAF values ± SEM for three (for pheophorbide A) and five (for bodipy prazosin) representative experiments are provided. Negative MAF values have been replaced with 0.

Table 4. Comparison of BCRP activity detection gills using BCRP probes and inhibitors of different specificity

BCRP Probe	Sildenafil	MK571	Ko134	Elacridar	Pranlukast
Bodipy prazosin	12 ± 8.3	38 ± 8.1	29 ± 6.4	18 ± 7.2	17 ± 10.5
Pheophorbide A	22 ± 4.2	13 ± 8	28 ± 7.1	17 ± 4.9	6 ± 15.2

Average MAF values ± SEM for four representative experiments are provided. Negative MAF values have been replaced with 0.

Article 4: Régulation des gènes du système MXR dans les branchies et les hémocytes de *Mytilus edulis*: effets des contaminants et de la saison

En préparation

Le phénotype MXR (MultiXenobiotic Resistance) est reconnu comme étant un biomarqueur d'exposition chez les organismes aquatiques. Des précédentes études ont montré l'induction de la P-glycoprotéine par les xénobiotiques organiques et leur surexpression dans les moules provenant de régions dégradées. Toutefois, la variation saisonnière des niveaux de transcrits dans les sites contaminés n'a jamais été décrite.

Dans cet article, l'expression des gènes de trois transporteurs ABC a été co-analysée dans les hémocytes et les branchies de *Mytilus edulis*. D'abord, des expériences au laboratoire ont été réalisées sous des conditions contrôlées. Une courte exposition aigue au benzo[a]pyrène a montré la modulation de l'expression des gènes abcb-, abcc- and abcg2-like avec une régulation positive dans les branchies et une sous régulation dans les hémocytes. L'étude terrain a confirmé la tendance observée au laboratoire. Les transcrits abcb- and abcg2-like sont moins abondants dans les hémocytes provenant du site contaminé. Dans les branchies, abcb-like est plus exprimée dans le groupe des moules contaminées. Toutefois, l'expression des gènes abc est instable au long des saisons d'échantillonnage. De plus, les effets saisonniers interagissent avec les effets sites résultant en une inversion ou une convergence des niveaux de transcrits. Seul abcb-like a montré un taux d'ARNm plus élevé dans les branchies des animaux collectés à partir du site plus impacté tout au long de l'étude diachronique. Ces résultats confirment l'adéquation de l'expression du gène abcb-like dans les branchies de *Mytilus edulis* en tant que biomarqueur d'exposition aux xénobiotiques sur le terrain

Regulation of Multixenobiotic resistance (MXR) genes in gills and hemocytes of *Mytilus edulis*: effects of contaminants and season

Yosra Ben Cheikh[§], Benoit Xuereb[§], Céline Boulangé-Lecomte[§], Gwendal Restoux[#], Aurélie Duflot[§] and Frank Le Foll[§]

Authors affiliation

[§] Laboratory of Ecotoxicology- Aquatic Environments, UMR-I 02, SEBIO, University of Le Havre, F-76063, Le Havre cedex, France.

[#] AgroParisTech-INRA, UMR1313, Génétique animale et biologie intégrative, Paris, France.

Abstract

The MXR (MultiXenobiotic Resistance) phenotype in aquatic organisms is recognized as a biomarker of exposure to contaminants. Previous studies have provided evidence that P-glycoprotein is inducible by organic xenobiotics and overexpressed in mussels from degraded areas. However, seasonal changes in transcript levels at contaminated sites has not been described previously. In this study, tissue-specific gene expression of three ABC transporters was co-analyzed in hemocytes and gills of *Mytilus edulis*. First, laboratory experiments were conducted under controlled static conditions. An acute short exposure to benzo[a]pyrene showed a modulation of abcb-, abcc- and abcg2-like gene expression with an upregulation in gills and a downregulation in hemocytes. The field study confirmed the trend observed in the laboratory. Abcb- and abcg2-like mRNAs were less abundant in hemocytes originating from the more impacted site by comparison to the reference area. In gills, abcb-like was more expressed in the contaminated mussel group. However, abc gene expression was unstable over sampling seasons. Furthermore, seasonal effects interact with site effects leading even to inversion or to convergence of transcript levels. Only the abcb-like gene displayed more abundant mRNAs levels in gills dissected from animals collected in the more polluted area all over the diachronic study.

Taken together, our results confirms the adequacy of abcb-like gene expression in mussel gills as a biomarker of xenobiotic exposure in the field.

Keywords: Multixenobiotic resistance, aquatic invertebrates, seasonal variation, contaminants, biomarkers

1. Introduction

Contaminants are defined as “substances or groups of substances that are toxic, persistent and liable to bio-accumulate” according to European Water Framework Directive 2000/60/EC. Contamination by complex toxicant mixtures are constantly reported from marine waters surveys and studies dedicated to chemical impregnation of coastal biota [1, 2]. The European marine and coastal policy aims to achieve good environmental status, especially by maintaining contaminants at concentrations not giving rise to pollution effects (Marine Strategy Framework Directive 2008/56/EC, descriptor 8). To meet this objective, plans of environmental management may monitor early warning indicators specific to pretoxic manifestations of xenobiotics in sentinel species [3]. These preliminary adaptive responses involve first various gene regulations to preclude further disruptive action of toxicants and therefore can be detected at the molecular level.

Among the biomarkers of exposure, recognized as promising methods for monitoring water pollution, is the mussel MultiXenobiotic Resistance (MXR) phenotype [4]. The MXR system, also called phase 0/III, is a primary cell detoxification mechanism mediated by membrane ATP Binding Cassette (ABC) efflux proteins [5]. These active transporters defense organisms against a variety of chemically unrelated toxicants and metabolites by preventing their accumulation in cells. Members of the ABC transporter family are widespread within living organisms, from bacteria to humans [6]. The MXR system can be considered as relatively well documented in aquatic species [5, 7], especially in freshwater and marine bivalves where it was first described [8–10]. In mussels, transcripts and efflux activities of different ABC transporters have been identified from various tissues, including ABCB/P-glycoprotein, ABCC/Multidrug Resistance Protein [11–16] and recently ABCG2/Breast Cancer Resistance Protein (Ben Cheikh Y., 2016 University of le Havre, le Havre, France, personal communication) subtypes.

In addition to providing a broad spectrum cell chemical protection, the MXR phenotype is also known to be induced by a large set of xenobiotics including biocides [8,17,18], polycyclic aromatic hydrocarbon [19] and metals [11], leading *de facto* to an increase of cross resistance toward toxicants. In bivalves, *abcb*- as well as *abcc*-like mRNA levels, protein expressions or transport activities have been explored in studies based on natural field populations [20], transplantation experiments [21] and laboratory exposures [11,22]. If limited data are yet available for ABCG2-like transporter subtype, induction of protein expression by biocides have been reported [8, 18].

Regarding all of these particular characteristics, the MXR system can be proposed as a biomarker of choice for an integrated biomonitoring of organisms exposure to environmental contamination. However, expression of ABC transporters in adult mussels has been reported to be additionally modulated by several confounding biological and physico-chemical parameters, independently of the pollution status of the environment. At various levels of the MXR system, *i.e.* mRNA, proteins or activity, variations are described according to tissues, temperature, salinity, dissolved oxygen, season and possibly to nutritional state or reproductive cycle [11,23–26]. Thus, interference of abiotic and biotic factors with biological responses may form a limit restricting the production of conclusive data and the standardization of analytical procedures.

In the present work, we have investigated by qPCR the potential use of genes encoding MXR related proteins as biomarker of environmental exposure to pollutants. The transcription level is fundamental to understand regulation of the MXR system because mRNAs corresponds to the first stage of protein regulation. Furthermore, molecular tools deliver additional information for the target phenotype, herein the relative variations of abundance of three *abc*-like mRNAs in tissues. QPCR is actually the unique way to obtain this information for MXR efflux actors in *Mytilus edulis*, since the lack of specific antibody and pharmacology restrains the distinction between ABC transporter subfamilies on the basis of protein expression or efflux activities.

In this study, for the first time in *Mytilus edulis*, variations of *abcb*-, *abcc*- and *abcg2*-like expression were co-analyzed in hemocytes and gills. In order to get data onto the response of *M. edulis* MXR system in front of a single environmental pollutant, we performed firstly a short time acute exposure to benzo[a]pyrene under static controlled conditions *in vivo*. Then, on the basis of the laboratory experiments, a diachronic field monitoring was carried out from two differentially polluted sites in Normandy (France) at different seasons.

2. Material and methods

2.1. Animals and sampling sites

The coastal marine environment of Villerville is located on borders of the Seine Estuary, a highly contaminated area. The Seine river has heavily contaminated water and sediment bodies originating from agricultural runoff, major cities waste water sewage (Paris, Rouen, Le Havre) and inputs from several industrial and petrochemical plants as well. The French marine environment monitoring network (Réseau d’Observation de la Contamination Chimique du littoral, ROCCH) managed by the Ministry of Environment, quantifies chemical contaminants in mussel tissues. Data presented in **Figure 1B** are available online at

<http://www.ifremer.fr/envlit/>, a website dedicated to coastal environment operated by IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER), and indicate mussel tissues contamination levels with various polychlorobiphenyl and polycyclic aromatic hydrocarbons, over periods covering 2012 to 2014, from sampling stations corresponding the rocky shore of Yport and Villerville. In our study, the intertidal rocky shore of Yport was chosen as the reference site because the poor chemical contamination.

Adult mussels, *M. edulis* with shell length ranging from 4 to 6 cm, were collected from the intertidal rocky shore of Yport or from the mouth of the Seine river at Villerville (**Figure 1A**) during February, April, September and December 2014. Animals were directly transported to the laboratory for immediate tissues sampling.

2.2. Mussel exposure to benzo[a]pyrene

After a seven days depuration period in UV-treated and filtered seawater, mussels sampled from the reference site Yport during February 2016, were exposed to benzo[a]pyrene (BaP) 5 mg/L (dissolved in Dimethyl sulfoxide) for 24 hours or to seawater as a control group. During the experiment, animals were maintained in tanks filled with 2 L with filtered sterile seawater (FSSW) under static conditions at 16 °C with aeration. No mortalities were observed.

2.3. Tissue collection

Hemolymph was withdrawn from the posterior adductor muscle sinus, by gentle aspiration with a 1 mL syringe equipped with a 22 G needle. Hemocyte samples consisted in five replicates per condition (field collected, control or laboratory exposed). For each replicate, hemolymph withdrawn from 10 mussels was pooled and centrifuged 5 min at 1200 g and supernatant was aspirated. For gills, 10 animals were dissected and tissues were gently removed individually. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use.

2.4. RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from hemocytes or from gills using RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacture's recommendations. RNA suspensions were treated with DNase (Turbo DNA free kit, Ambion) for genomic DNA removal. Total RNA concentration was analyzed by spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Scientific). RNA integrity was checked by electrophoresis on 1 % agarose gel with SYBR staining (SYBR Safe DNA gel stain, Invitrogen). Reverse transcription was carried out from total RNA (1 µg) using M-MLV RNase H minus (100 U, Promega) and oligo (dT)20 (1 µg) in the presence of Recombinant RNasin®

Ribonuclease Inhibitor (80 U, Promega). Complementary first-strand DNA (cDNA, 40 µL) were diluted in 60 µL of ultra-pure water and stored in 5 µL aliquots at -20°C until use.

2.5. qRT-PCR analysis

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) analysis was conducted on the Rotor-Gene Q 2-plex HRM (Qiagen) using the QuantiTect® SYBR® Green Master Mix (2X, Qiagen). Each reaction was run in duplicate with a final volume of 20 µL containing 5 µL cDNA and 0.5 µM of each primer. Specific qPCR primers for *abcb*-like, *abcc*-like, *abcg2*-like and the Elongation factor *ef1α* were designed using ProbeFinder software (<https://lifescience.roche.com/>, **Table 1**). *Ef1α* was chosen as housekeeping gene because of its stability from different experimental conditions [27].

Reactions were initiated with a denaturation step for 15 min at 95 °C followed by 45 cycles at 94 °C for 15 s, 59 °C for 30 s and 72 °C for 6s. The melting curve was finally determined during a slow temperature elevation from 60 to 95 °C (1 °C/s). Each run included blank controls (water).

To obtain qPCR efficiencies of each primer pair used, standard curves were generated using eight serial dilutions of cDNA (from 10⁹ to 10¹ copies) [28]. The expression levels of the target genes, normalized to the *ef1α* housekeeping gene, was then calculated using the $(1+\text{efficiency})^{-\Delta C_t}$ formula. The modulation of mRNA transcription upon 24 h exposure to BaP was measured using the $\Delta\Delta C_t$ method according to Pfaffl [29]. Data are presented as fold increase in expression of the target genes (*abcb*-, *abcc*- and *abcg2*-like) with respect to controls.

2.6. Statistical analysis

The normalized expressions of target genes (*abcb*-, *abcc*- and *abcg2*-like) were all treated the same way. Data were first transformed through a logit function. Transformed observations were then analyzed using a fixed effect linear model accounting for the date (February, April, September or December), the location (Villerville or Yport), the “tissue” (gills or hemocytes) and their interactions up to the second order as follow,

$\text{logit}(\Delta c_{ijk}) = \mu + \text{Site}_i + \text{Organ}_j + \text{Month}_k + \text{Site}_i \times \text{Organ}_j + \text{Site}_i \times \text{Month}_k + \text{Organ}_j \times \text{Month}_k + \varepsilon_{ijk}$, with the residuals defined as $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma_{ijk})$ and μ the general mean (*i.e.* the intercept). These computations were conducted using R 3.3.1 (R core Team, 2016). Results were finally compared using adjusted means (*i.e.* least squares means) computed with the “lsmeans” R package. We applied corrections for multiple testing in order to adjust the level of significance.

The subsequent linear predictions (with 95% confidence intervals) were then graphically presented in interaction plots using the “ggplot2” R package.

3. Results

3.1. Effect of BaP exposure on abc gene expression

The expression of ABC transporters genes was investigated in *Mytilus edulis* hemocytes and gills after 24h exposure to BaP 5 mg/L. Firstly, the variation of normalized transcript levels in control and exposed groups was plotted according to the box and whiskers representation. Then, the relative expression of each gene after exposure to contaminant was determined.

In hemocytes, the abundance variability was disparate amongst the abc genes considered (**Figure 2**). Abcb- and in some respect abcg2-like genes exhibited a narrow range of expression levels in both control and exposed mussels (**Figure 2A, C**). In contrast, abcc-like transcript levels appeared more dispersed especially in non-exposed animals (**Figure 2B**). Exposure to BaP caused a marked downregulation of all abc gene expressions relatively to controls (**Figure 2D**).

In gills, abcb-like transcripts displayed the largest dispersion of expression levels in control mussels (**Figure 3A**) while values for abcc- and abcg2-like genes were more homogenous (**Figure 3B, C**). However, when exposed to the contaminant, abcc- and abcg2-like transcript levels were more scattered specially abcc gene. Animal exposure to BaP induced an upregulation of the three abc gene expression at different degrees (**Figure 3D**). Changes were relatively moderate for the abcb- (1.2 folds) and abcg2- (1.95 folds) transcripts and obviously more pronounced for abcc-like gene (15.4 folds).

3.2. Seasonal abc gene expression in the field population

ABC transporter gene expression was evaluated in field populations of mussels sampled from two sites differentially impacted by chemical pollutants at different periods of the year (**Figure 4, Figure 5**). In hemocytes, transcripts levels of abcb-, abcc- and abcg2-like MXR transporters fluctuated significantly during the sampling periods (**Figure 4**). Altogether, the highest gene expression level was observed in February for the three transporters, excepting for abcg2- specifically in samples from Yport (highest level in April). Then, the transcript levels decreased in April and September and increased in December. Only abcc-like transcripts analyzed from Villerville mussels decreased continuously until the last month. Moreover, abcb- and abcg2-like transcripts initially similar in both sites in February were then more abundant in Yport the rest of the year (significant data for abcg2-like). In contrast, the abcc- gene was more expressed

in Villerville hemocytes during April and September (no significant data) and similar at the other seasons.

Similarly to what obtained in hemocytes, abc gene expression in gills was higher at the beginning of the year and then continuously decreased (**Figure 5**). In contrast, the peak of abcg2-like expression in samples from Yport was observed in April. Interestingly, the abcb-like gene was significantly more expressed in mussel gills originating from the polluted site over all seasons. In this respect, no differences were noted for the abcc-like transporter. The abcg2-like gene expression level was less stable, being initially higher in Villerville and lower the rest of the year.

When averaging over all seasons, abcg2-like expression in hemocytes was significantly higher in Yport than in Villerville. Similarly, after averaging over the four sampling dates for gills, only abcb-like expression was significantly higher in Villerville. No other significant season-averaged difference was detected for other combination of genes by tissue.

4. Discussion

This work reports the evaluation of one component of the MXR phenotype in *Mytilus edulis*, the abundance of gene transcripts in tissues, as a biomarker of exposure to water pollution. Using specific qPCR primers, we have co-analyzed for the first time the expression level of genes corresponding to ABCB/P-glycoprotein-, ABCC/Multidrug Resistance associated Protein- and ABCG2/Breast Cancer Resistance Protein-like products in hemocytes and gills of mussels obtained from collection sites with contrasted contamination status and at different seasons of the year 2014. Qualitatively, all three of these transcripts encoding MXR efflux proteins were found in both tissues of animals from less (Yport) and more polluted (Villerville) areas. Quantitatively, the abundance of transcripts appeared sometimes variable from sample to sample and according to the origin of the tissues.

4.1. Laboratory experiments

To investigate the modulation of ABC transporter gene expression by xenobiotics, animals were exposed to BaP at 5 mg/L in the laboratory under static controlled conditions. Among contaminants, this polycyclic aromatic hydrocarbon was chosen because it has been detected at high concentration in mussel tissues in Normandy [30]. Even if the used concentration in our study is not environmental realistic, the short time acute exposure allowed to have a rapid response without altering animal viability. Indeed, 24 h BaP exposure provoked an upregulation of abcb-, abcc- and abcg2-like in mussel gills and a downregulation in hemocytes.

Some studies described the ability of this contaminant to regulate abc gene expression in aquatic organisms. Ferreira et al. reported that abcc1 and abcc2 transcript increase dose dependently upon 24 h exposure to BaP levels in European seabass hepatocytes [31]. Similarly, in the presence of BaP, abcc2 and abcg2 mRNAs have been shown to be upregulated in Nile tilapia gills and in the liver and proximal intestine, respectively [32]. Similar responses were observed with bivalve ABC transporters. For example, P-gp gene expression was induced in gills of *Dreissena polymorpha* [33] and *Mytilus edulis* [19]. In our experiments and in accordance with these findings, the induction observed in the gills confirms the adequacy of ABC transporter gene expression measurement as a tool to evaluate PAH exposure. Among the monitored transcripts however, quantification of abcc-like mRNAs seems less indicated because of the large dispersion of expression levels obtained after exposure to BaP.

Opposite responses were observed in hemocytes, where all three transporters were downregulated after BaP exposure. Available data concerning abc gene regulation by chemicals in bivalve hemocytes are rather limited. Nevertheless and in a good agreement with our observations, downregulations of abcb-like expression in *Mytilus* hemocytes exposed to toxic compounds have been reported for cadmium [11] and for fluoxetine [34]. Hence, pollutant-induced variations of abc mRNA levels appear to differ amongst tissues. Such discrepancies may be accounted for by distinctive physiological roles of those transporters and consequently a possible involvement of particular signaling pathways. Many studies discussed the capacity of BaP to alter functions of blood cells in invertebrates [35–37]. Interestingly, Franzellitti and Fabbri established a correlation between the downregulation of P-gp gene, c-AMP levels and the protein kinase (PKA) activity in hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* exposed to fluoxetine [34]. Therefore, it can be hypothesized that the control of abcb-, abcc- and abcg2-like expression in hemocytes and gills relies on distinct regulatory mechanisms. However, the present knowledge of involved mechanisms remains scarce and need further studies.

4.2. Field experiments

In our field study, abc transcripts showed fluctuations over time amongst sampling sites in both tissues. In hemocytes originating from the polluted site, abcb- and abcg2-like mRNAs were less abundant by comparison to the reference area. In gills, abcb-like was more expressed in the contaminated mussel group. Taken together, these trends correspond to the pattern obtained from laboratory exposure to BaP. However, abc gene expression was unstable over sampling seasons. Obviously, seasonal effects interact with site effects leading even to inversion or to convergence of expression levels. To explain these fluctuations, an influence of water

temperature on the MXR phenotype in mussels can be evoked as suggested by previous works. For example, in the field, a positive correlation between environmental water warming and protein expression in *Mytilus galloprovincialis* [26], *Dreissena polymorpha* [20] and *Crassostrea virginica* [24, 38] was pointed out. By contrast, in laboratory conditions, Tutundjian and Minier rejected the interference of temperature with MXR expression in zebra mussels [39]. It should be additionally noted that according to regional meteo-climatic conditions, the presence and distribution of xenobiotics within environmental compartments can considerably vary. Intense precipitations resulted for instance in particle resuspension, increasing the bioavailability of contaminants for filter feeders. Consequently, the highest level of transcript observed in February could be related to a higher amount of contaminants. In warmer periods appearance of large amount of algal toxins may also regulate ABC transporter expression. In this respect, Buratti et al. have reported a downregulation of P-gp and mrp2 genes in mussels exposed to the paralytic shellfish toxin (PST) [23]. Detailed lifehistory traits of individual mussels are necessary to decipher the causality of ABC transporter gene expression. Noticeably however, the abcb-like gene was measured as overexpressed in gills originating from Villerville all over the four sampling periods.

5. Conclusion

This study evaluates the use of ABC transporters gene expression measurements in the blue mussel as a potential biomarker of exposure to water contaminants. Laboratory experiments indicate that a short term BaP exposure modulates abc gene transcript levels with an upregulation in gills and a downregulation in hemocytes. Our field study confirms the trend observed in the laboratory. Furthermore, it reveals strong interactions between abc transcript levels, seasonal variability and site pollution. Only the abcb-like gene displayed more abundant mRNAs levels in gills dissected from animals collected in the more polluted area all over the study. Therefore, abcb-like gene expression could be considered as site-specific, less subjected to non-pollutant influence and more indicated for biomonitoring applications. The present work also confirms the importance of considering the role of confounding factors in biomarker studies. Further investigations are needed to understand how abiotic factors can interfere with abc gene expression in the mussel.

Acknowledgements

This work received fundings from the State/Region Plan Contract (CPER) allocated through the Research Federation FR CNRS 3730 SCALE (Sciences Appliquées à L'Environnement), from the project IPOC supported by the Agence Nationale de la Recherche “Interactions between POLLution and Climate changes: development of improved monitoring strategy” project (ANR-12-ISV7-0004) and from the GIP Seine-Aval project Ecotones. Yosra Ben Cheikh was a recipient for a Ph.D. grant from the Conseil Regional de Haute-Normandie.

References

- [1] Kasiotis, K.M., Emmanouil, C., Anastasiadou, P., Papadi-Psyllou, A., Papadopoulos, A., Okay, O., Machera, K., 2015. Organic pollution and its effects in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* in Eastern Mediterranean coasts. *Chemosphere* 119 Suppl, S145-152.
- [2] Tappin, A.D., Millward, G.E., 2015. The English Channel: Contamination status of its transitional and coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 95, 529–550.
- [3] Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 25, 272–280.
- [4] Report of the ICES/OSPAR Workshop on Assessment Criteria for Biological Effects Measurements (WKIMC) - wkimc_2009.pdf
- [5] Ferreira, M., Costa, J., Reis-Henriques, M.A., 2014. ABC transporters in fish species: a review. *Front. Physiol.* 5.
- [6] Higgins, C.F., 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67–113
- [7] Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389.
- [8] Kingtong, S., Chitramvong, Y., Janvilisri, T., 2007. ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. *Aquat. Toxicol.* 85, 124–132.
- [9] Kurelec, B., Pivcević, B., 1989. Distinct glutathione-dependent enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a fresh-water mussel *Anodonta cygnea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 934–940.
- [10] Smital, T., Sauerborn, R., Pivcević, 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. Toxicol. Pharmacol. CBP* 126, 175–186.
- [11] Della Torre, C., Bocci, E., Focardi, S.E., Corsi, I., 2014. Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Mar. Environ. Res.* 93, 56–63.
- [12] Faria, M., Navarro, A., Luckenbach, T., Piña, B., Barata, C., 2011. Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 101, 78–87.
- [13] Luckenbach, T., Epel, D., 2008. ABCB- and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R1919-1929.

- [14] Luedeking, A., Van Noorden Cornelis J. F., Koehler A., 2005. Identification and characterisation of a multidrug resistance-related protein mRNA in the blue mussel *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. 286,167-175.
- [15] Marin, M., Legros, H., Poret, A., Leboulenger, F., Le Foll, F., 2004. Cell responses to xenobiotics: comparison of MCF7 multi-drug- and mussel blood cell multi-xenobiotic-defense mechanisms. Mar. Environ. Res. 58, 209–213.
- [16] Rioult, D., Pasquier, J., Boulangé-Lecomte, C., Poret, A., Abbas, I., Marin, M., Minier, C., Le Foll, F., 2014. The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 153, 98–109.
- [17] Eufemia, N., 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. Amst. Neth. 49, 89–100.
- [18] Oliveira, I.B., Groh, K.J., Stadnicka-Michalak, J., Schönenberger, R., Beiras, R., Barroso, C.M., Langford, K.H., Thomas, K.V., Suter, M.J.-F., 2016. Tralopyril bioconcentration and effects on the gill proteome of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 177, 198–210.
- [19] Prevodnik, A., Lilja, K., Bollner, T., 2007. Benzo[a]pyrene up-regulates the expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and multixenobiotic resistance polyglycoprotein (P-gp) in Baltic Sea blue mussels (*Mytilus edulis* L.). Comp. Biochem. Physiol. Part C 145, 265–274.
- [20] Minier, C., Abarnou, A., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A.-M., Tutundjian, R., Bocquené, G., Leboulenger, F., 2006. A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Environ. Toxicol. Chem. SETAC 25, 112–119.
- [21] Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. Aquat. Toxicol. 67, 347–357.
- [22] Smital, T., Sauerborn, R., Hackenberger, B.K., 2003. Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 65, 443–465.
- [23] Buratti, S., Franzellitti, S., Poletti, R., Ceredi, A., Montanari, G., Capuzzo, A., Fabbri, E., 2013. Bioaccumulation of algal toxins and changes in physiological parameters in Mediterranean mussels from the North Adriatic Sea (Italy). Environ. Toxicol. 28, 451–470.
- [24] Keppler, C., Ringwood, A.H., 2001a. Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects. Aquat. Toxicol. 54, 195–204.
- [25] Luckenbach, T., Corsi, I., Epel, D., 2004. Fatal attraction: synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mussels. Mar. Environ. Res. 58, 215–219.

- [26] 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.
- [27] Lacroix, C., Coquillé, V., Guyomarch, J., Auffret, M., Moraga, D., 2014. A selection of reference genes and early-warning mRNA biomarkers for environmental monitoring using *Mytilus* spp. as sentinel species. *Mar. Pollut. Bull.* 86, 304–313.
- [28] Xuereb, B., Forget-Leray, J., Souissi, S., Glippa, O., Devreker, D., Lesueur, T., Marie, S., Danger, J.-M., Boulangé-Lecomte, C., 2012. Molecular characterization and mRNA expression of grp78 and hsp90A in the estuarine copepod *Eurytemora affinis*. *Cell Stress Chaperones*.
- [29] Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- [30] Abarnou, A., Duchemin, J., 2005. Distribution et devenir de contaminants persistants dans les écosystèmes littoraux. Comparaison Manche ouest-Manche est
- [31] Ferreira, M., Santos, P., Rey-Salgueiro, L., Zaja, R., Reis-Henriques, M.A., Smital, T., 2014b. The first demonstration of CYP1A and the ABC protein(s) gene expression and activity in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) primary hepatocytes. *Chemosphere* 100, 152–159.
- [32] Costa, J., Reis-Henriques, M.A., Castro, L.F.C., Ferreira, M., 2012. Gene expression analysis of ABC efflux transporters, CYP1A and GSTα in *Nile tilapia* after exposure to benzo(a)pyrene. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 155, 469–482.
- [33] Châtel, A., Faucet-Marquis, V., Perret, M., Gourlay-Francé, C., Uher, E., Pfohl-Leszkowicz, A., Vincent-Hubert, F., 2012. Genotoxicity assessment and detoxification induction in *Dreissena polymorpha* exposed to benzo[a]pyrene. *Mutagenesis* 27, 703–711.
- [34] Franzellitti, S., Fabbri, E., 2013. Cyclic-AMP mediated regulation of ABCB mRNA expression in mussel haemocytes. *PLoS ONE* 8, e61634.
- [35] Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, M.P., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 17, 539–546.
- [36] Gopalakrishnan, S., Huang, W.-B., Wang, Q.-W., Wu, M.-L., Liu, J., Wang, K.-J., 2011. Effects of tributyltin and benzo[a]pyrene on the immune-associated activities of hemocytes and recovery responses in the gastropod abalone, *Haliotis diversicolor*. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 154, 120–128.
- [37] Matozzo, V., Monari, M., Foschi, J., Cattani, O., Serrazanetti, G.P., Marin, M.G., 2009. First evidence of altered immune responses and resistance to air exposure in the clam *Chamelea gallina* exposed to benzo(a)pyrene. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 479–488.
- [38] Keppler, C., Ringwood, A.H., 2001b. Expression of P-glycoprotein in southeastern oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 52, 81–96.
- [39] Tutundjian, R., Minier, C., 2007. Effect of temperature on the expression of P-glycoprotein in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *J. Therm. Biol., Role of Thermal Environment in Stress Adaptation and Tolerance: Ingegration of Multiple Stressors* 32, 171–177.

Figure legends

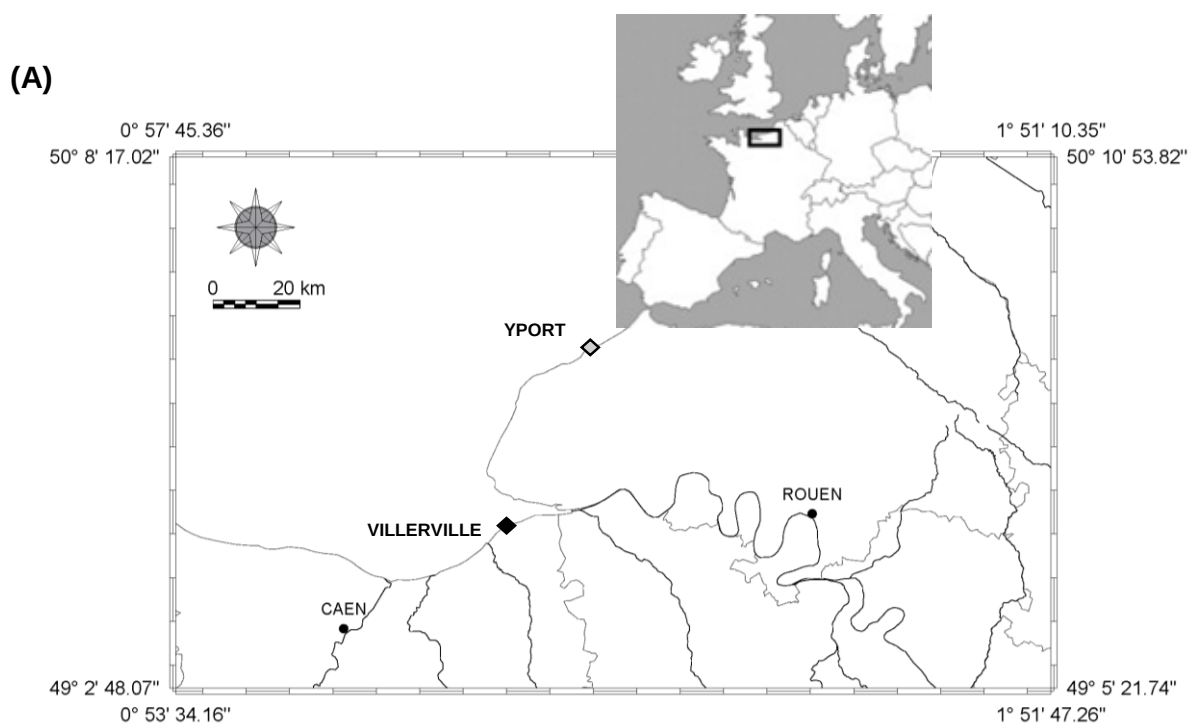
Figure 1. Map of La Pointe de Caux (Normandy), the northern part of the Bay of Seine. (A) Two mussel sampling sites were selected as differentially impacted by contaminants, the mouth of the Seine at Villerville ♦ where the animals are highly exposed to xenobiotics and in the rocky shore of Yport ◇, a less contaminated area. Inset: a larger view of the sampling fields. (B) Table presenting concentration of PAHs and PCBs ($\mu\text{g/kg}^{-1}$ dry weight) in mussel tissues in the period 2012-2014 as determined by the French marine environment monitoring network (ROCCH) and available at <http://www.ifremer.fr/envlit/>, a website dedicated to coastal environment operated by IFREMER.

Figure 2. Effect of BaP exposure on the expression of *abcb*-, *abcc*- and *abcg2*-like genes in mussel hemocytes. A-C, distribution of normalized *abc* transcript levels in control and exposed groups (BaP 5mg/L, 24h) represented by box-and-whisker plots (n=5). The boxes indicate median, 25th and 75th percentile (box) and the whiskers represent the 1.5 interquartile range. D, *abc* gene expression changes relatively to control after exposure to BaP, individual samples are represented by open circles and means by bars (n=5).

Figure 3. Effect of BaP exposure on the expression of *abcb*-, *abcc*- and *abcg2*-like genes in mussel gills. A-C, distribution of normalized *abc* transcript levels in control and exposed groups (BaP 5mg/L, 24h) represented by box-and-whisker plots (n=10). The boxes indicate median, 25th and 75th percentile (box) and the whiskers represent the 1.5 interquartile range. D, *abc* gene expression changes relatively to control after exposure to BaP, individual samples are represented by open circles and means by bars (n=10).

Figure 4. Model predictions for the expression of *abc*-like genes in mussel hemocytes collected from the field in 2014. The normalized *abc* transcript levels were determined in hemocytes withdrawn from animals obtained in mussels beds of Yport and Villerville areas in 2014. Bars represent confidence intervals at 95% (n=5).

Figure 5. Model predictions for the expression of *abc*-like genes in mussel gills collected from the field in 2014. The normalized *abc* transcript levels were determined in gills dissected from animals obtained in mussels beds of Yport and Villerville areas in 2014. Bars represent confidence intervals at 95% (n=10).



(B)

Site	Yport			Villerville		
Year	2012	2013	2014	2012	2013	2014
PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ dry weight)	84.93	98.07	-	187.74	280.53	204.18
PCBs ($\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ dry weight)	174.26	113.06	-	244.82	513.21	524.81

(-) not available

Figure 1. Map of La Pointe de Caux (Normandy), the northern part of the Bay of Seine.

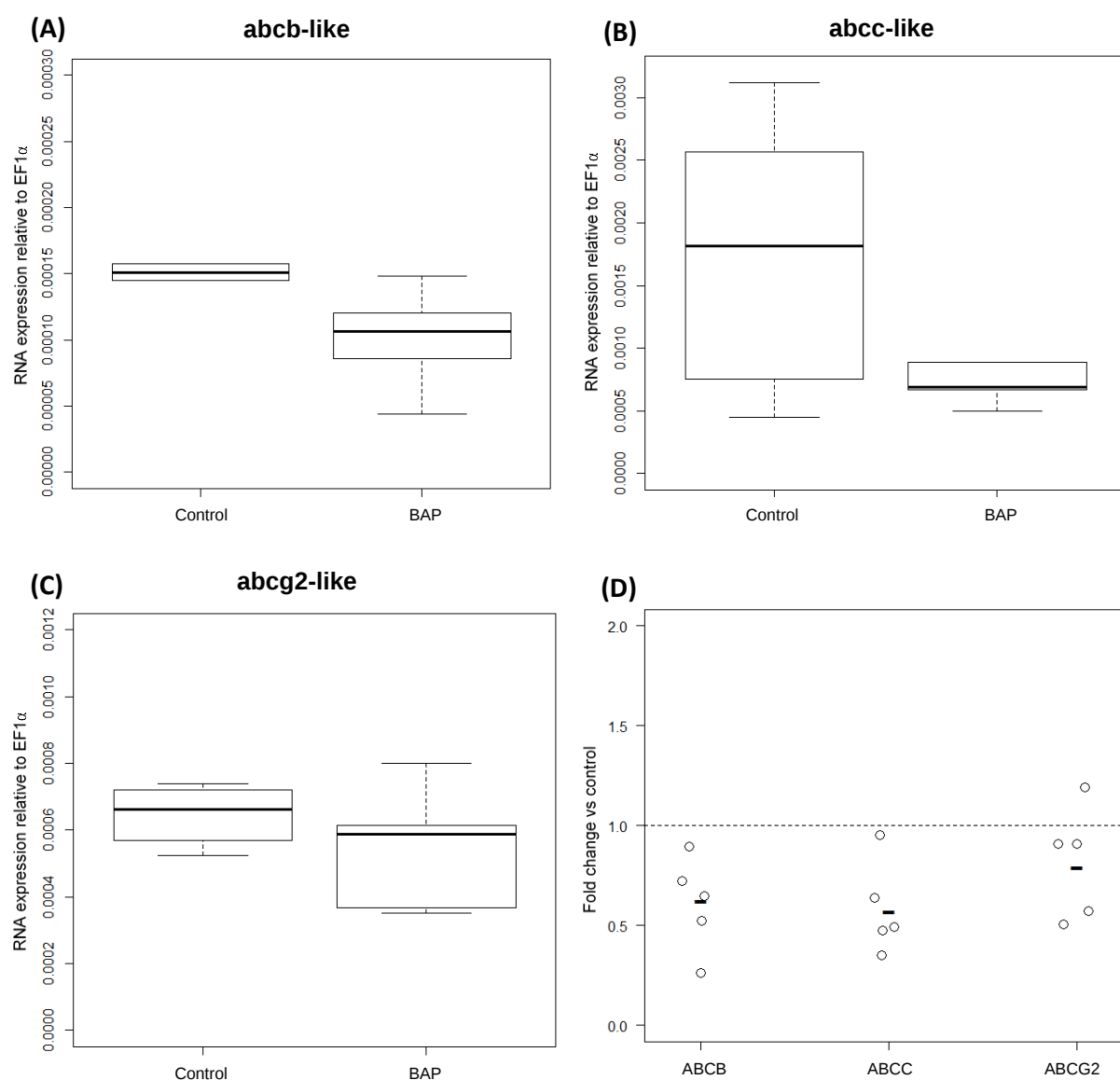


Figure 2. Effect of BaP exposure on the expression of abcb-, abcc- and abcg2-like genes in mussel hemocytes.

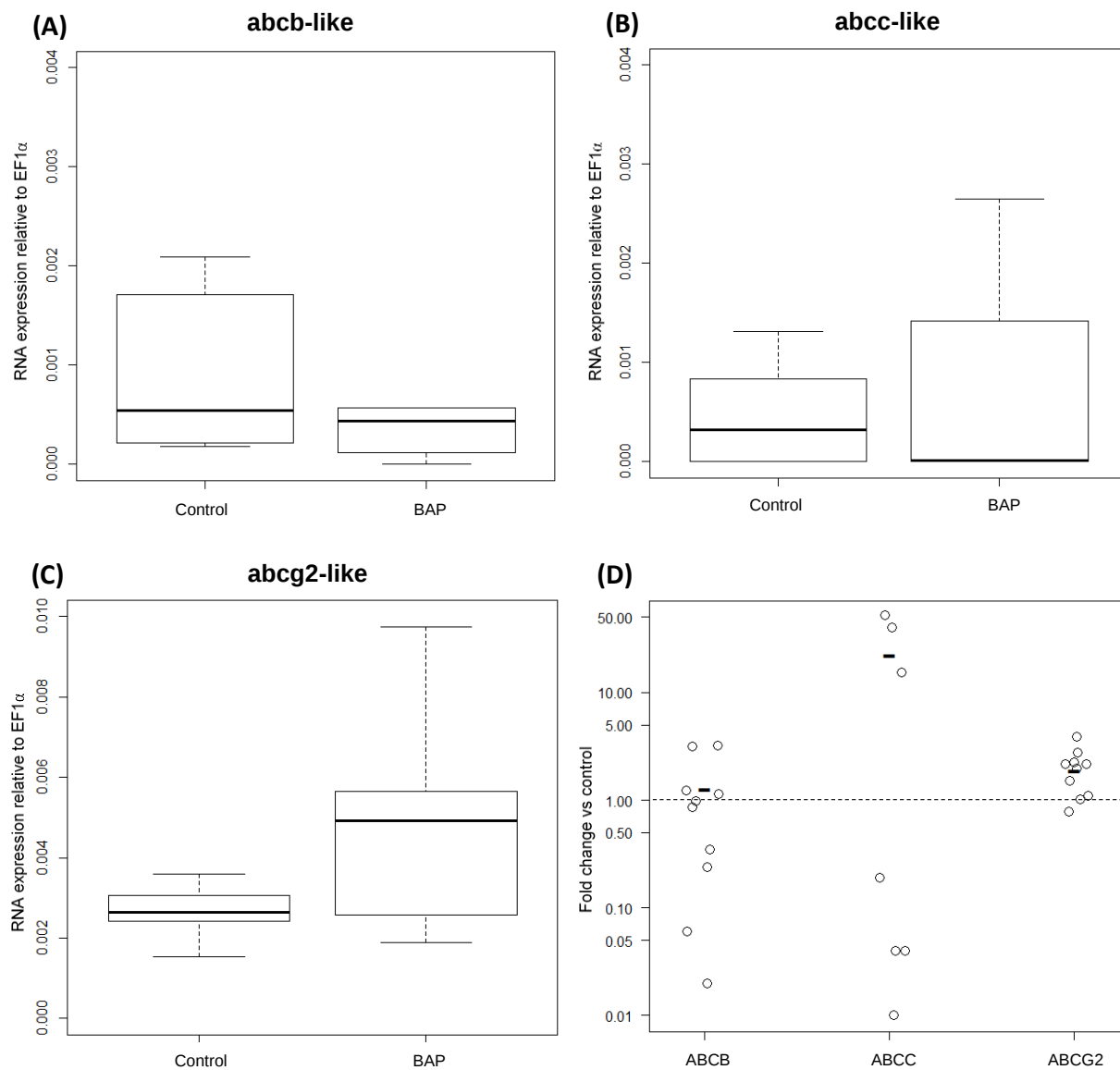


Figure 3. Effect of BaP exposure on the expression of abcb-, abcc- and abcg2-like genes in mussel gills.

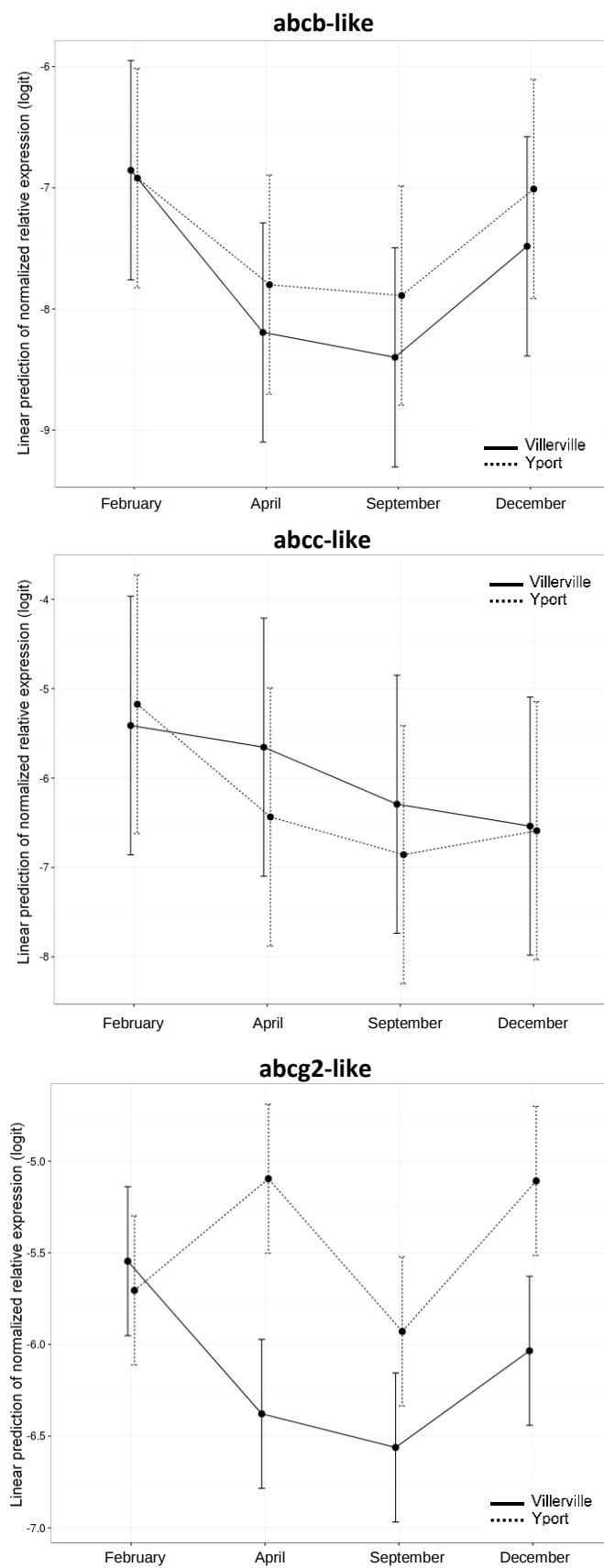


Figure 4. Model predictions for the expression of abc-like genes in mussel hemocytes collected from the field in 2014.

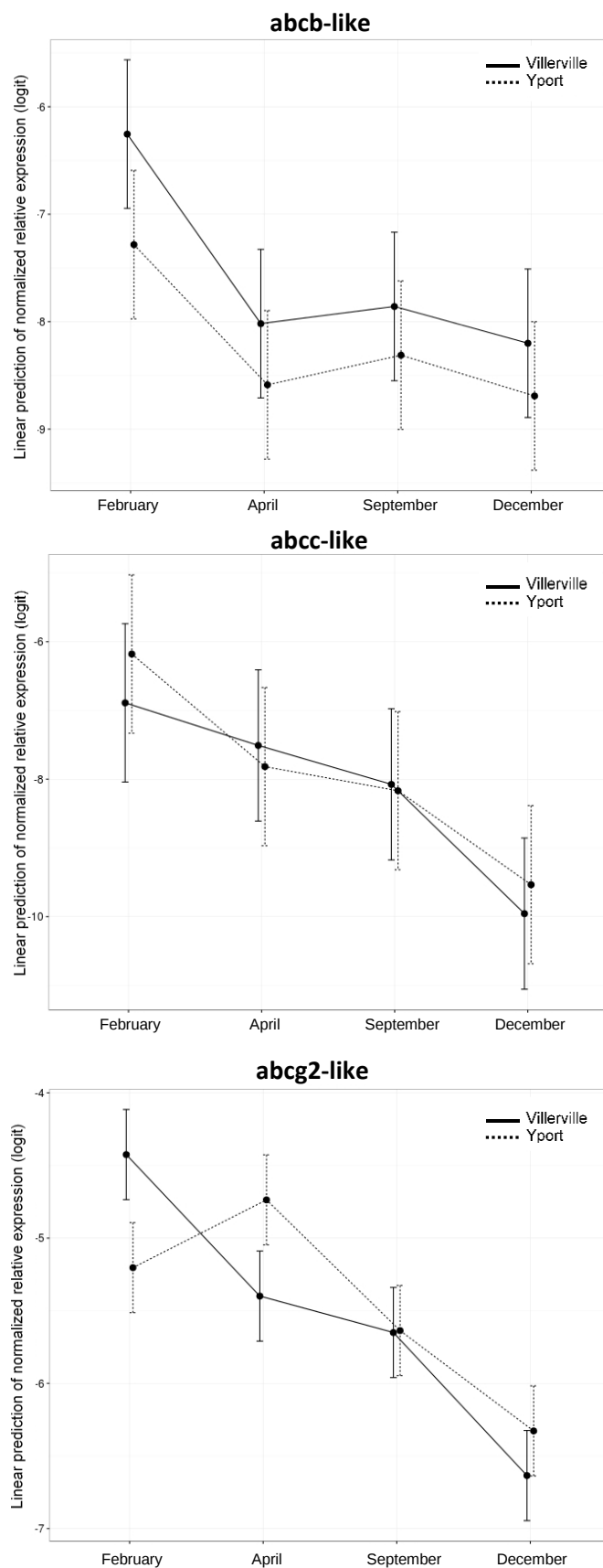


Figure 5. Model predictions for the expression of abc-like genes in mussel gills collected from the field in 2014

Tables

Table 1. Primers used in qPCR expression analysis

Gene	Accession number	Fw 5'-3'	Rev 5'-3'	Annealing (T _m °C)	E	Amplicon size
<i>ef1a</i>	AF063420.1	CCGTAGAAATGCACCACGA	TTGAAACCAACATTGTCTCCTG	60	2	61 pb
<i>abcb</i>	AF159717.1	TGATCAGAGACCCAAGAATCC	TGCCTTTTCTAGAGCTTCCTGT	59	2.05	95 pb
<i>abcc</i>	AF397143.1	CCACCGCTGCTGTAGATTTAG	GCGCTATAGTTAGAACAGTGCAGTC	59	1.94	90 pb
<i>abcg</i> 2	KX551963	TGTGCTATTTTAGATGAACCAACA	TCCTTCCTTTTAATGCTAATCTTCTC	59	1.84	95 pb

E: efficiency

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La moule bleue a longtemps été reconnue pour sa résistance aux contaminants chimiques et biologiques. Toutefois, cette espèce sentinelle est confrontée depuis quelques années à des mortalités pouvant atteindre 100% des individus dans les élevages des Pertuis Charentais (Bechemin et al., 2014). Les premières investigations ont suggéré l'implication de bactéries du genre *Vibrio* sans exclure un rôle potentiel de conditions hydro-climatiques particulières (Travers et al., 2016). Dans ce contexte, ces travaux de thèse visent à étudier les mécanismes de défense de *Mytilus edulis* contre les bactéries pathogènes et les xénobiotiques. Le premier volet est dédié aux interactions d'isolats bactériens avec l'organisme hôte, à des échelles physiologique et cellulaire. Le deuxième volet explore le fonctionnement du système de résistance aux xénobiotiques (MXR) dans les hémocytes et les branchies de la moule bleue par des approches moléculaires et biochimiques.

I. Étude des interactions entre *M. edulis* et *V. Splendidus* sp.

1. Isolement et caractérisation de *V. splendidus* 10/068 1T1, pathogène de *M. edulis*

Contrairement aux autres bivalves, aucun vibron n'est reconnu comme étant un agent pathogène des bivalves du genre *Mytilus* (Travers et al., 2016). Certains auteurs ont évoqué un phénomène de résistance des moules aux maladies infectieuses trouvant son origine dans un système immunitaire puissant (Balbi et al., 2013; Tanguy et al., 2013b). Cette hypothèse émane de plusieurs études fonctionnelles des hémocytes en réponse à des bactéries connues pour leur pathogénicité envers d'autres organismes (Costa et al., 2009; Parisi et al., 2008). Toutefois, la virulence d'un microbe est une propriété strictement dépendante de l'hôte (Casadevall and Pirofski, 2009) et dans le cadre des études précitées, la pathogénicité des microorganismes envers *Mytilus* n'a pas été vérifiée. Toutes ces observations nous amènent à une question majeure : la moule est-elle réellement exceptionnellement résistante aux bactéries ou bien les agents infectieux virulents n'ont-ils pas encore été isolés ?

Pour répondre à cette question, nous avons testé pour la première fois la virulence de différentes souches bactériennes qui ont été isolées de *Mytilus edulis* sur des animaux moribonds dans le contexte de mortalité mytilicole sur la période 2010-2013 ou bien à partir du microbiote d'organismes apparemment sains. Les infections expérimentales par injection ont permis de mettre principalement en évidence une bactérie pathogène, codée 10/068 1T1, appartenant au groupe *V. Splendidus* et affiliée à l'espèce *V. splendidus/hemicentroti* (76.6%

de mortalités 24h post-injection, **article 1**). D'autres isolats obtenus pareillement présentaient une virulence de degré moindre et de cinétique différente.

La caractérisation phylogénétique basée sur le gène de ménage *gyrB* a permis l'affiliation des isolats au groupe *V. Splendidus* et aux espèces *V. splendidus/V. hemicentroti* et *V. lentus/V. atlanticus*. Toutefois, le pathotype virulent ne peut pas être distingué en se fondant sur la classification génétique puisque les souches virulentes sont phylogénétiquement proches des souches inoffensives. En accord avec ces résultats, une prédominance des bactéries du groupe *V. Splendidus* a été démontrée dans la microflore de la moule australienne *M. galloprovincialis* (Kwan and Bolch, 2015). Similairement, une étude plus récente sur des souches isolées de moules bleues saines ou moribondes a confirmé leur affiliation au groupe *Splendidus* et l'absence de corrélation entre l'espèce et le phénotype de virulence (Oden et al., 2016). De plus, les auteurs ont identifié un isolat *V. splendidus* M3H obtenu à partir d'animaux moribonds lors des mortalités massives en Charentes maritime en 2014 et capable d'induire 80% de mortalité après 7 jours. Dans cette même étude, la classification des isolats a été faite suivant une analyse des séquences multilocus (MLSA) en excluant *V. hemicentroti* ce qui rend la comparaison avec nos résultats difficile. Néanmoins, considérant la proximité phylogénétique de *V. splendidus* et de *V. hemicentroti*, il est possible que les deux souches appartiennent à la même espèce.

Ainsi, avec ces résultats, l'implication de souches apparentées à *V. splendidus* dans les mortalités de la moule bleue est confirmée. Dans ce contexte, il serait intéressant d'élargir les travaux à tous les isolats collectés durant ces dernières années sur plusieurs sites de façon à préciser le ou les pathotypes virulents.

2. *V. splendidus* 10/068 1T1 altère les fonctions hémocytaires

Les hémocytes jouent un rôle important dans la défense immunitaire et dans la résistance contre les envahisseurs. Parmi les processus mis en place par les agents pathogènes durant l'infection, on trouve l'altération des fonctions hémocytaires.

Les bactéries du genre *Vibrio* sont connues pour être des pathogènes extracellulaires. Elles évitent la phagocytose notamment à travers la sécrétion d'exotoxines dans leurs produits extracellulaires. Par exemple, *V. tubiashii* 07/118 T2 sécrète des protéases toxiques capables de réduire l'adhésion cellulaire et la phagocytose des hémocytes de *C. gigas* (Mersni-Achour et al., 2014). De même, les ECPs de *V. aestuarianus* 01/32 inhibent l'attachement cellulaire ainsi que l'internalisation des billes de latex utilisées pour quantifier l'activité phagocytaire et

stimulent la production de ROS tandis que la bactérie n'a aucun effet sur ces fonctions (Labreuche et al., 2006). Dans notre étude, les produits sécrétés de *V. splendidus* 10/068 1T1 contribuent aux processus infectieux puisqu'ils réduisent l'activité phagocytaire et diminuent la production de ROS. Toutefois, il semble que ces effets ne soient pas les seuls mécanismes d'action de la bactérie. En effet, ce vibron affecte les différents stades de la phagocytose allant de l'attachement au substrat à la destruction des corps ingérés par les hémocytes. En contact direct avec les hémocytes, *Vibrio* 10/068 1T1 réduit la motilité et l'adhésion cellulaire, envahit les cellules, inhibe la libération des radicaux libres et la maturation du phagolysosome. À l'inverse, la souche inoffensive *V. splendidus* 12/056 M24T1 induit une activation des hémocytes traduite par une hausse de la motilité, un stress oxydatif, la formation de vacuoles acides. De plus, elle n'a aucun effet sur l'adhésion cellulaire et la viabilité (**article 1 et 2**).

L'inhibition de la fusion lysosome-phagosome est une stratégie d'évasion adoptée par certains agents infectieux intracellulaires pour échapper à leur destruction ; c'est par exemple le cas des bactéries *Mycobacterium* et *Legionella* (Armstrong and Hart, 1971; Horwitz, 1983). Depuis peu, de plus en plus d'espèces de *Vibrio* pathogènes sont décrites pour avoir des stades de vie intracellulaire. En effet, *V. shiloi* pénètre dans les cellules épithéliales du corail *Oculina patagonica*, se différencie en forme viable non cultivable et produit une toxine qui inhibe la photosynthèse des zooxanthelles (Rosenberg and Falkovitz, 2004). De même, *V. parahaemolyticus* envahit les cellules hôtes et échappe de la vacuole avant sa fusion avec les lysosomes pour se multiplier dans le cytosol (Santos and Orth, 2014). Seul *V. tasmaniensis* LGP32 est décrit pour envahir uniquement des phagocytes professionnels. Il survit dans les hémocytes de *C. gigas* en inhibant la production de ROS et la maturation du phagolysosome (Duperthuy et al., 2011). De plus, il a été récemment démontré que cette bactérie est capable de résister à la phagocytose des protistes environnementaux (Poirier, 2016) tout comme *V. cholerae* qui se réplique dans l'amibe *Acanthamoeba castellanii* (Van der Henst et al., 2016).

Au vu de ces données, il paraît que *V. splendidus* 10/068 1T1 développe des mécanismes infectieux similaires à ceux de *V. tasmaniensis* LGP32. Outre l'inhibition des ROS et de la maturation du phagolysosome, la bactérie a un effet cytotoxique sur les hémocytes (39% de cellules mortes après 18h de contact). L'ensemble de ces résultats suggère la survie intrahémocytaire de la bactérie. Toutefois, il reste à vérifier si l'effet cytotoxique est une conséquence de la lyse cellulaire et la libération des bactéries comme le cas de *V. tasmaniensis* LGP32 (Vanhove et al., 2016). Par ailleurs, il serait intéressant d'explorer les mécanismes

impliqués dans le dysfonctionnement des réponses immunitaires et de comparer avec ceux des autres membres virulents du groupe *V. Splendidus*.

3. *V. splendidus* 10/068 1T1 infecte *Mytilus edulis* en endommageant les branchies

Les études sur les interactions hôte-pathogène reposent le plus souvent sur la caractérisation des réponses immunitaires. Il est vrai que l'interférence avec les mécanismes de défense fait partie intégrante du processus infectieux. Néanmoins, pour comprendre le mode d'action du pathogène, il est important de définir toute cible potentielle qui lui permet de coloniser les tissus de son hôte et de se multiplier.

Dans ce travail, nous avons suivi les dynamiques d'infection de *V. splendidus* 10/068 1T1 via un modèle de cohabitation. Le choix d'une technique d'expérimentation non invasive permet de se rapprocher au mieux des voies naturelles d'infection utilisées par la bactérie. D'une manière intéressante, la balnéation n'a pas induit de mortalité chez la moule bleue contrairement à la cohabitation (**article 2**). Ce résultat indique l'importance pour la bactérie d'avoir un support pour initialiser sa virulence. En effet, les *Vibrio* régulent l'expression de leurs facteurs de virulence en fonction de leur environnement. Par exemple, l'expression de la toxine cholérique est réprimée par la sécrétion de la bile dans l'intestin jusqu'à ce que *V. cholerae* atteigne le mucus où la concentration de bile est faible ce qui déclenche l'induction de la synthèse du TCP (Toxine Coregulated Pilus) suivie de l'expression de la toxine cholérique CT ([Krukons and DiRita, 2003](#)). Pour *V. splendidus*, il serait intéressant d'identifier les facteurs de virulence induits lors du séjour dans l'hôte et de rechercher leur rôle dans la contamination des autres individus.

Le suivi de la bactérie GFP dans l'eau de mer, les tissus et l'hémolymphe permet de reconstituer une chronologie de contamination. Le pathogène semble nécessiter une phase d'incubation (2 jours) pour pénétrer l'hôte, le coloniser et se multiplier. Pendant cette période, aucune mortalité n'est observée et le taux de bactéries dans l'eau diminue suggérant leur transfert aux animaux sains et l'absence de relargage dans le milieu. En même temps, *V. splendidus* envahit essentiellement les filaments branchiaux et est aussi détecté dans les hémocytes circulants. De plus, les coupes histologiques des animaux moribonds montrent des lésions au niveau de la branchie confirmant son ciblage par le pathogène.

Toutefois, le rôle des hémocytes pendant le processus infectieux reste à éclaircir. L'augmentation de la concentration des cellules circulantes et la détection des bactéries internalisées nous amènent à penser qu'elles véhiculent le pathogène. En effet, les hémocytes peuvent jouer un rôle dans la propagation de l'infection dans le système circulatoire mais aussi faciliter son entrée dans l'hôte. A ce sujet, des études ont discuté l'implication des hémocytes dans la transmission de la leucémie chez la palourde ([Metzger et al., 2015](#)). D'autres ont montré la capacité des hémocytes de traverser l'épithélium muqueux et donc de transporter des bactéries ([Allam and Pales Espinosa, 2016](#)). En se basant sur nos résultats et cette dernière hypothèse, une illustration du processus infectieux de *V. splendidus* 10/068 1T1 est proposée (**Figure 25**).

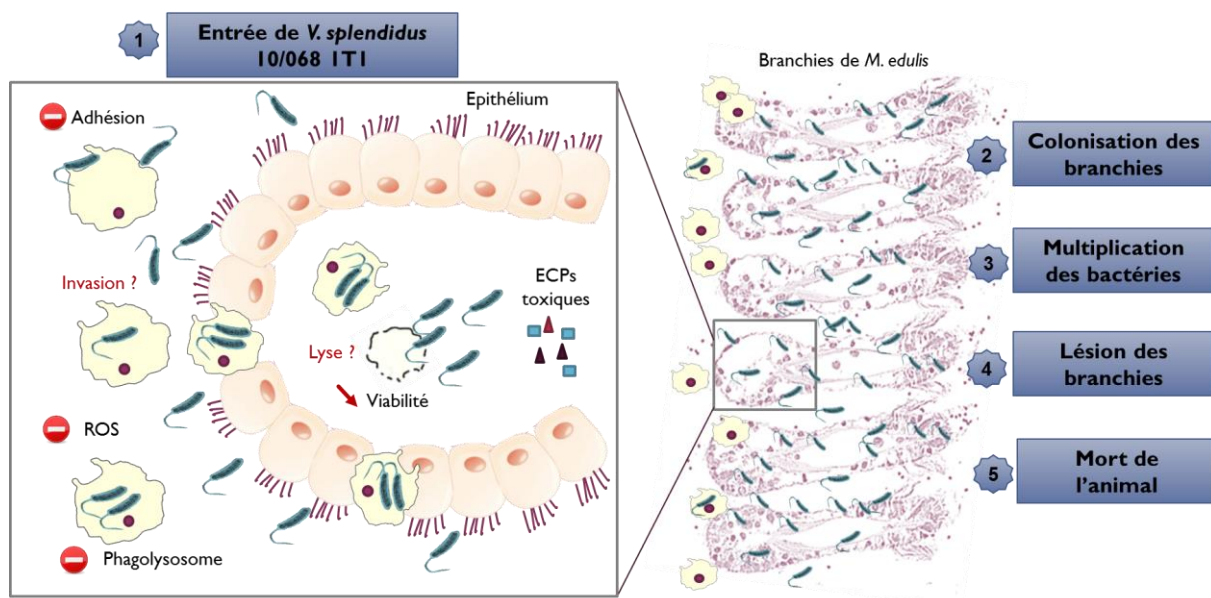


Figure 25. Représentation du processus infectieux de *V. splendidus* 10/068 1T1 d'après l'ensemble des résultats obtenus

Pour compléter ce schéma, il serait important d'identifier la voie d'entrée du pathogène, qu'elle soit reliée ou non aux hémocytes. Une caractérisation des effecteurs de virulence notamment parmi les produits extracellulaires, est également nécessaire pour mieux comprendre le mode d'action de la bactérie.

II. Le système MXR chez *Mytilus edulis*

1. Le transporteur ABCG2 contribue au phénotype MXR chez *M. edulis*

L'ABCG2/BCRP/MXR, pour *Breast Cancer Resistance Protein*/Mitoxantrone *Resistance Protein* (ne pas confondre avec MXR pour *MultiXenobiotic Resistance*), est un membre la 3^{ème} sous famille la plus connue de transporteurs ABC chez les mammifères. Ce transporteur a été caractérisé chez certaines espèces de vertébrés marins comme les poissons (Ferreira et al., 2014), tandis que peu de données sont disponibles pour les invertébrés aquatiques. En effet, les études du système MXR chez les invertébrés en général, et les bivalves en particulier, ont été focalisées pour la plupart sur les types ABCB/Pgp et, depuis peu, sur la ABCC/MRP (cf. introduction : chapitre 2 : paragraphe III.3). A notre connaissance pour abcg2, seuls le transcrit homologue et la protéine ont été mis en évidence, respectivement chez la palourde asiatique *C. fluminea* (Chen et al., 2015) et l'huitre *S. forskali* (Kingtong et al., 2007). Aucune caractérisation moléculaire ou fonctionnelle n'ont été proposées auparavant.

Dans notre étude, la famille l'ABCG2 a été identifiée chez *Mytilus edulis* (**article 3**). Similairement à la Pgp, le niveau de transcrits abcg2 est moins important dans les hémocytes que dans les branchies (**article 3 et 4**). Cette différence d'expression, décrite également chez *M. galloprovincialis* et *C. farreri* (Della Torre et al., 2014; Miao et al., 2014), peut correspondre à des fonctions distinctes pour ces transporteurs selon les tissus ou même cellules et à leur implication ou non dans la détoxification des xénobiotiques. Du fait de leur position anatomique chez les filtreurs, les branchies sont plus exposées aux contaminants aquatiques. Néanmoins, pour étayer cette hypothèse, il est indispensable de vérifier cette surexpression au niveau protéique et surtout au niveau fonctionnel.

Nous avons établi la séquence d'acides aminés à partir de la branchie. La protéine a la structure typique du demi-transporteur comportant les motifs conservés des pompes ABC. Par ailleurs, l'alignement des séquences en acides aminés montre une homologie avec les autres protéines ABCG2 de différentes espèces de vertébrés et invertébrés allant de 49% pour la protéine humaine à 98% pour celle identifiée chez *M. galloprovincialis*. Ce dernier résultat confirme la conservation du transporteur à travers les espèces, particulièrement au sein du même genre taxonomique. En effet, une forte similarité est également observée pour d'autres pompes ABC dans le genre *Mytilus*. Selon la base de données NCBI, *M. galloprovincialis* a respectivement 95% et 89% d'identité avec la Pgp et la Mrp de *M. californianus*. Il serait intéressant de comparer les similarités fonctionnelles des protéines.

2. ABCG2 est un transporteur actif dans les hémocytes et les branchies

La détection d'un transcrit dans un tissu n'indique pas systématiquement la présence de la protéine fonctionnelle. Dans notre étude, nous avons utilisé des allocrites fluorescents du transporteur humain BCRP, le bodipy prazosin et le pheophorbide A, pour explorer l'activité de l'ABCG2 chez *Mytilus edulis*. L'activité d'efflux dans les hémocytes et les branchies est confirmée après l'ajout des inhibiteurs spécifiques (**article 3**). De plus, il semble que l'activité d'efflux soit plus particulièrement localisée dans certaines régions tissulaires ou sous-populations cellulaires. Dans les branchies, les deux sondes sont plus effluées au pôle antérieur tandis que pour les hémocytes, le bodipy est plus accumulé dans les éosinophiles et, à l'inverse, le pheophorbide A est plus concentré dans les basophiles (en condition basale ou en présence des bloqueurs). L'hétérogénéité observée dans les populations hémocytaires dépendante de la sonde utilisée peut être expliquée par la présence d'une autre pompe transportant le même allocrite et donc contribuant au phénotype d'efflux. En effet, le bodipy prazosin est connue pour être pris en charge par la Pgp en plus de la BCRP (Chufan et al., 2013; Kimchi-Sarfaty et al., 2002) contrairement au pheophorbide A qui est spécifique à la BCRP (Robey et al., 2004). La présence de la Pgp dans les hémocytes de *Mytilus* sp. reste cependant très discutée. Des résultats contradictoires ont été obtenus en combinant une sonde fluorescente avec des inhibiteurs connus pour leur action sur la Pgp humaine (Riout et al., 2014; Zaja et al., 2006). Malgré la remarquable conservation des transporteurs ABC entre les espèces, les différences au niveau des séquences protéiques peuvent se traduire par des disparités fonctionnelles et pharmacologiques des protéines. Dans ce cas, dans la mesure où la spécificité des bloqueurs est fondée sur la pharmacologie humaine, leur faible efficacité chez les bivalves n'indique pas forcément l'absence du transporteur. De plus, certaines substances peuvent manquer de sélectivité. En effet, dans notre étude nous démontrons l'action de l'inhibiteur classique de la MRP MK571 sur l'accumulation des substrats de l'ABCG2. Par conséquent, il est indispensable de caractériser une batterie de sondes allocrites et de modulateurs propres aux espèces d'intérêt. D'après nos résultats, nous pouvons construire un diagramme de Venn qui réunit les sondes allocrites et les bloqueurs pharmacologiques pour le phénotype MXR de *M. edulis* (**Figure 26**).

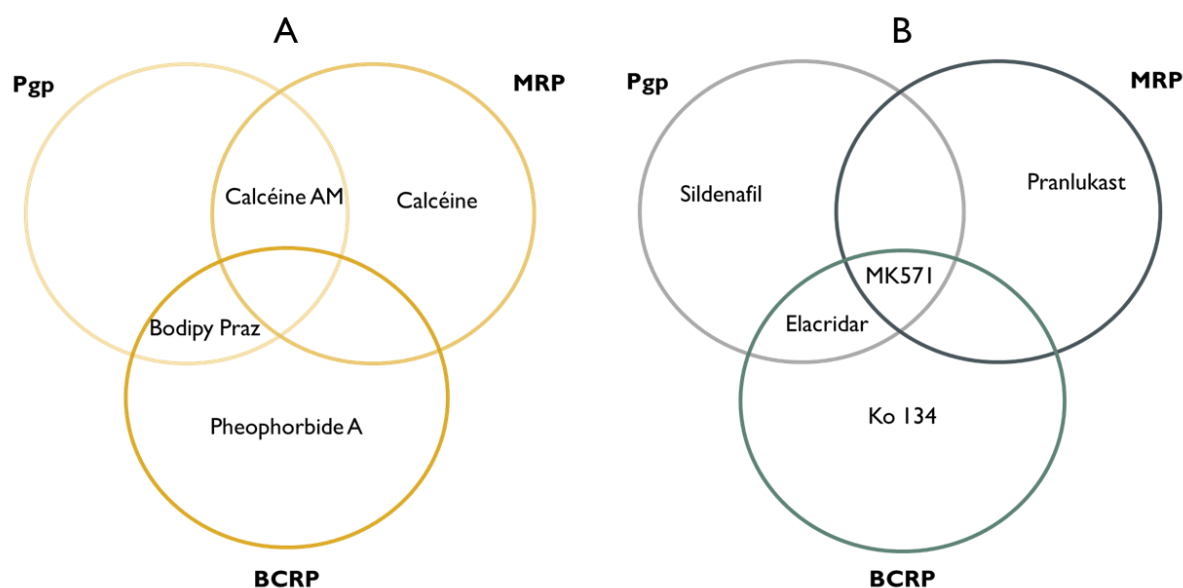


Figure 26. Diagrammes de Venn représentant les sondes fluorescentes allocrites (A) et les inhibiteurs (B) des transporteurs ABC chez *Mytilus edulis*

L'étude du système MXR est plus complexe dans les hémocytes que les autres tissus. Au-delà de l'hétérogénéité des populations cellulaires, la présence de plusieurs types de transporteurs potentiellement dans différents systèmes membranaires ou endomembranaires (membrane plasmique ou membrane des organites subcellulaires) et à substrats similaires complique l'interprétation des données. L'existence de transporteurs ABC au niveau subcellulaire a été discutée chez *Mytilus edulis* mais pas démontrée (Svensson et al., 2003). Dans notre étude, l'observation microscopique des hémocytes marquées avec la calcéine AM démontre une accumulation majeure de la sonde dans le cytosol puis une concentration dans les lysosomes en présence de MK571 (**Figure 27**). Ce dernier résultat indique clairement la présence d'un transporteur ABCC intracellulaire qui efflue la calcéine au niveau de membrane lysosomale.

Au vu de ces données, il serait intéressant d'identifier les protéines situées dans les compartiments intracellulaires et d'étudier la différence avec celle localisées dans la membrane plasmique ainsi que leurs rôles. Pour cela, le développement de nouvelles approches pour la distinction des différents effecteurs permettant leur caractérisation individuelle s'impose. Récemment, Jordão et al. (2016) ont sélectionné des clones de daphnies résistants aux substrats chimiques de la Pgp pour étudier l'activité d'efflux de la protéine sans l'interférence de la Mrp exprimé également dans l'organisme. Tandis que Fischer et al. (2013) ont synthétisé une

protéine recombinante ABCB4 du poisson zèbre pour explorer son rôle dans la défense contre les produits toxiques.

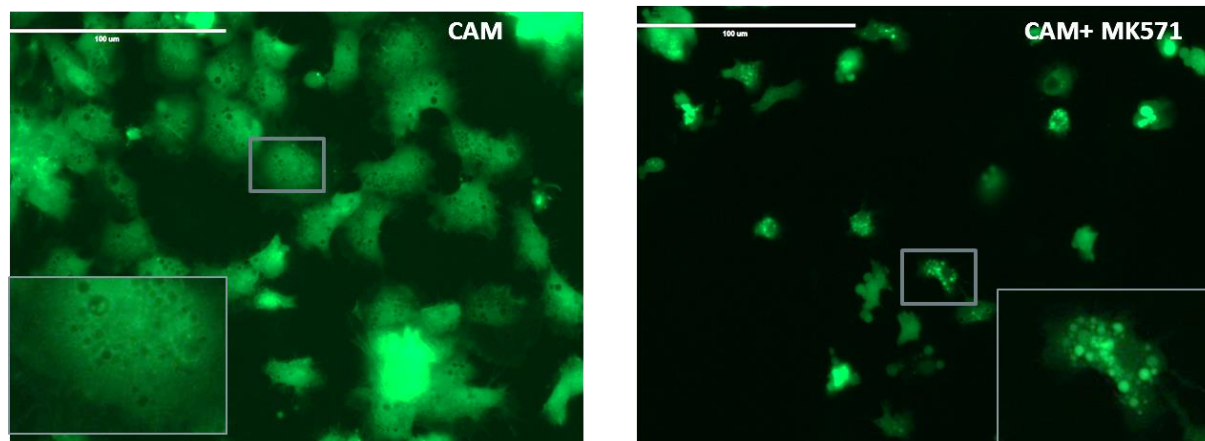


Figure 27. Observation microscopique des hémocytes incubés avec la calcéine AM (CAM) à 0.25 μM pendant 15 min en absence ou en présence du bloqueur MK571 (30 μM , 30 min)

3. Modulation de l'expression des gènes par les contaminants

La modulation du système MXR, particulièrement de la Pgp, par les xénobiotiques a été auparavant décrite au niveau génique et protéique (cf. introduction : chapitre 2 : paragraphe III.4). Considérant la multitude des transporteurs identifiés chez *Mytilus edulis* et le manque d'outils pour la distinction entre les différentes activités, nous avons exploré l'effet des contaminants sur les niveaux de transcrits des trois pompes ABC (**article 4**).

L'exposition des moules au BaP engendre une surexpression des 3 gènes *abcb*, *abcc* et *abcg2* dans les branchies et une sous-expression dans les hémocytes. L'induction de l'expression de l'*abcb* est souvent décrite dans les branchies de plusieurs espèces de bivalves en réponse à des contaminants (Bonnafé et al., 2015; Della Torre et al., 2014; Miao et al., 2014; Ratkaj et al., 2015). Par contre le peu de données concernant les hémocytes rapporte une régulation négative des transcrits ABCB (Della Torre et al., 2014; Franzellitti and Fabbri, 2013) et ABCC (Franzellitti et al., 2016) après contact avec les xénobiotiques. D'une part, ce résultat peut suggérer un rôle différent de celui de pompe à xénobiotique pour les transporteurs ABC dans les hémocytes. Dans ses travaux de thèse, Damien Rioult a décrit l'inhibition de la motilité des hémocytes en présence du MK571 et a suggéré l'implication de la MRP dans la migration cellulaire par l'intermédiaire du transport de chimiokines comme les leucotriènes ou les CCL19

et CCL21, sans toutefois le démontrer (Riout, 2013). Par ailleurs, une corrélation directe entre la sous-expression de l'ARNm de l'ABCB et l'inhibition de l'activité PKA/AMPC a été mise en évidence (Franzellitti and Fabbri, 2013). Par conséquent, on pourrait penser que les transporteurs ABC jouent un rôle dans la migration des hémocytes de la moule bleue via la voie PKA/AMPC connue pour son implication dans la régulation cytosquelettique et la migration cellulaire (Howe, 2004). Une étude plus approfondie des mécanismes de régulation du système MXR aiderait dans la définition des fonctions des pompes ABC autres que la détoxification.

D'autre part, la régulation génique ne reflète pas l'effet sur l'activité d'efflux de la protéine. Une relation a été établie entre la surexpression de l'*abcb* et l'activité d'efflux induite dans les branchies de *M. galloprovincialis* après exposition au cadmium *in vitro* tandis qu'aucun effet n'a été observé *in vivo*. Des résultats similaires ont été obtenus pour les hémocytes après des expériences *in vivo* et *in vitro*. Toutefois ces auteurs affirment l'absence de la Pgp dans ces cellules (Della Torre et al., 2014). Ces résultats nous amènent à penser que l'induction fonctionnelle des transporteurs ABC peut nécessiter plus de temps. En accord avec cette hypothèse, l'exposition des moules au BaP pendant 24h n'a pas d'effet sur l'activité des trois pompes ABC dans les branchies et les hémocytes (observations personnelles). De ce fait, une étude cinétique sur des temps d'exposition plus longs est nécessaire.

Les profils d'expression des gènes *abc* chez les moules prélevées à partir des deux sites différemment pollués sont plus complexes (**article 4**). Néanmoins, deux points majeurs sont notables. Un effet site similaire à celui de l'exposition au laboratoire est distingué. En effet, les transcrits *abcb* et *abcg2* sont plus abondants dans les branchies des individus contaminés tandis qu'une régulation négative est observée pour les hémocytes des animaux prélevés du site pollué. Par conséquent, il semblerait que les gènes *abc* aient la même réponse face à une contamination unique ou multiple. Ce résultat renforce les hypothèses émises sur le fonctionnement des transporteurs ABC chez *Mytilus edulis*.

Le deuxième point remarquable de l'étude terrain est la variabilité saisonnière des niveaux de transcrits au cours de l'année et son interférence avec l'effet site. La multitude des paramètres environnementaux et physiologiques pouvant moduler l'expression des gènes ne permet pas de conclure sur le facteur responsable du phénotype observé d'autant plus que la régulation n'est pas la même pour tous les transporteurs. En effet, au cours de certaines périodes, le niveau d'ARNm des ABC dans les deux sites varient dans le même sens ou à l'inverse. Seul le transcrit *abcb* est exprimé plus abondamment dans les branchies des moules du site pollué tout au long de l'année. L'ensemble de ces résultats affirme l'importance de la

considération de la variation saisonnière dans les études reliées au développement de biomarqueurs. Même si l'expression de l'abcb dans les branchies semble être un indicateur de l'état de pollution de l'environnement, étendre l'étude sur d'autres sites avec une contamination semblable s'avère indispensable pour valider les résultats observés.

III. Conclusion générale et perspectives

Ces travaux de thèse montrent clairement la vulnérabilité de *Mytilus edulis* face à un agent pathogène de type *Vibrio*. Les réponses différentielles de l'animal, sur le plan physiologique et immunitaire, aux deux souches bactériennes testées ont permis de distinguer le haut degré de virulence de *V. splendidus* 10/068 1T1. Une caractérisation des facteurs de virulence du pathogène pourrait aider à mieux comprendre le déroulement du processus infectieux. Par ailleurs, les causes de l'émergence des agents infectieux étant encore inconnues, il serait intéressant d'étudier le rôle des facteurs environnementaux dans la contribution à la mise en place de la maladie. A cet égard, une première expérience a été effectuée afin d'évaluer l'effet d'un stress chimique sur la réponse de la moule à une souche bactérienne non virulente. La co-exposition des animaux au BaP et aux bactéries non virulentes *V. splendidus* 12/056 M24T1 a induit 83% de mortalité après 4 jours (**Figure 28**). Tandis qu'en présence soit du BaP soit des bactéries, le taux de mortalité est faible (respectivement 23% et 13% après 4 jours).

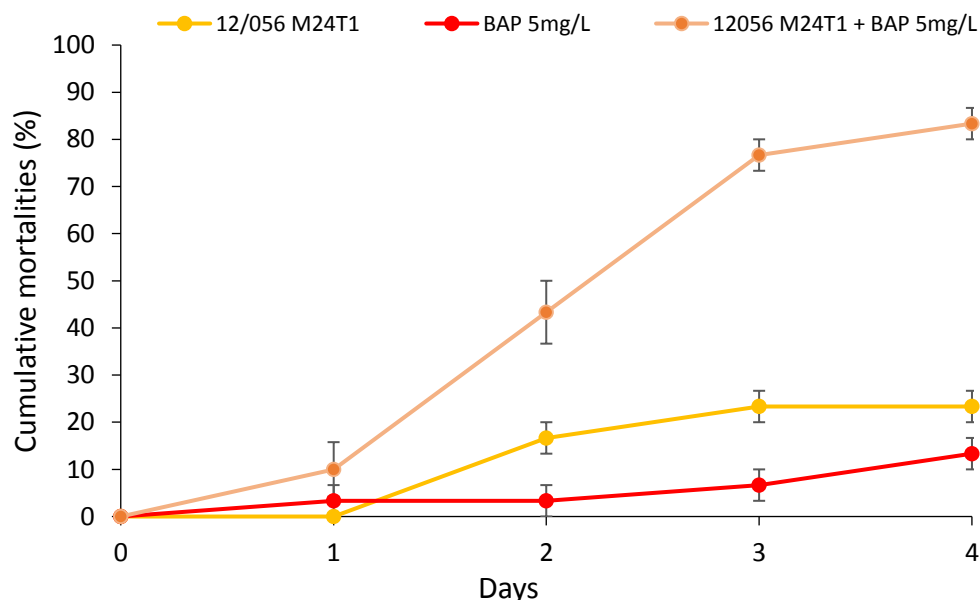


Figure 28. Mortalités accumulées des moules après exposition aux bactéries non virulentes 12/056 M24T1 (injection intramusculaire de 100 μ L de suspension bactérienne à $DO_{600}=1$) ou/et au BaP (5mg/L), n=3, SEM

Ce dernier résultat suggère un affaiblissement des défenses immunitaires de l'animal après contamination chimique ce qui engendre un taux de mortalité élevé. Par conséquent, il est indispensable d'explorer l'effet des contaminants sur la réponse des hémocytes aux bactéries. L'implication du système MXR dans la motilité cellulaire est également à étudier étant donné l'interférence des contaminants avec les mécanismes de détoxification.

Références

-A-

- Abraham, T.J., Rahman, M.K., Joseph, M.T.L., 1996. Bacterial disease in cultured spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus). *Journal of Aquaculture in the Tropics* 11, 187–192.
- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* 67, 347–357. [doi:10.1016/j.aquatox.2004.01.014](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.01.014)
- Ács, A., Imre, K., Kiss, G., Csaba, J., Győri, J., Vehovszky, Á., Farkas, A., 2015. Evaluation of multixenobiotic resistance in dreissenid mussels as a screening tool for toxicity in freshwater sediments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 707–717. [doi:10.1007/s00244-015-0150-y](https://doi.org/10.1007/s00244-015-0150-y)
- Akaishi, F.M., St-Jean, S.D., Bishay, F., Clarke, J., da S Rabitto, I., de Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 82, 1–14. [doi:10.1016/j.aquatox.2007.01.008](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.01.008)
- Alderman, D.J., 1985. Shell disease of oysters.
- Allam, B., Paillard, C., Ford, S.E., 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis. Aquat. Organ.* 48, 221–231. [doi:10.3354/dao048221](https://doi.org/10.3354/dao048221)
- Allam, B., Pales Espinosa, E., 2016. Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place? *Fish Shellfish Immunol.*, Special Issue: ISFSI 2016 53, 4–12. [doi:10.1016/j.fsi.2016.03.037](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.037)
- Allen, Y., Scott, A.P., Matthiessen, P., Haworth, S., Thain, J.E., Feist, S., 1999. Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1791–1800. [doi:10.1002/etc.5620180827](https://doi.org/10.1002/etc.5620180827)
- Allikmets, R., Schriml, L.M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V., Dean, M., 1998. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 58, 5337–5339.
- Alsina, M., Blanch, A.R., 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 79–85. [doi:10.1111/j.1365-2672.1994.tb04419.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04419.x)
- Alvarez, M.R., Friedl, F.E., Roman, F.R., 1995. *In vivo* chemoactivation of oyster hemocytes induced by bacterial secretion products. *J. Invertebr. Pathol.* 66, 287–292. [doi:10.1006/jipa.1995.1102](https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1102)
- Amaro, C., Biosca, E.G., 1996. *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1454–1457.

- Ambudkar, S.V., Kim, I.-W., Xia, D., Sauna, Z.E., 2006. The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS Lett.* 580, 1049–1055. doi:10.1016/j.febslet.2005.12.051
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015
- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Rainbow, P.S., 2016. Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects. CRC Press.
- Andrus, C.R., Walter, M., Crosa, J.H., Payne, S.M., 1983. Synthesis of siderophores by pathogenic *Vibrio* species. *Curr. Microbiol.* 9, 209–214. doi:10.1007/BF01567583
- Armstrong, J.A., Hart, P.D., 1971. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J. Exp. Med.* 134, 713–740.
- Arzul, I., Nicolas, J.-L., Davison, A.J., Renault, T., 2001. French scallops: A new host for ostreid herpesvirus-1. *Virology* 290, 342–349. doi:10.1006/viro.2001.1186
- Asokan, R., Arumugam, M., Mullainadhan, P., 1997. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Dev. Comp. Immunol.* 21, 1–12.
- Attridge, S.R., Manning, P.A., Holmgren, J., Jonson, G., 1996. Relative significance of mannose-sensitive hemagglutinin and toxin-coregulated pili in colonization of infant mice by *Vibrio cholerae* El Tor. *Infect. Immun.* 64, 3369–3373.
- Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D., Duchemin, M., 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 393–405. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.10.016

-B-

- Bag, P.K., Nandi, S., Bhadra, R.K., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S.K., Nishibuchi, M., Hamabata, T., Yamasaki, S., Takeda, Y., Nair, G.B., 1999. Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2354–2357.
- Bakos, É., Evers, R., Szakács, G., Tusnády, G.E., Welker, E., Szabó, K., Haas, M. de, Deemter, L. van, Borst, P., Váradi, A., Sarkadi, B., 1998. Functional multidrug resistance protein (Mrp1) lacking the n-terminal transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* 273, 32167–32175. doi:10.1074/jbc.273.48.32167
- Balbi, T., Fabbri, R., Cortese, K., Smerilli, A., Ciacci, C., Grande, C., Vezzulli, L., Pruzzo, C., Canesi, L., 2013. Interactions between *Mytilus galloprovincialis* hemocytes and the bivalve pathogens *Vibrio aestuarianus* 01/032 and *Vibrio splendidus* LGP32. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1906–1915. doi:10.1016/j.fsi.2013.09.027
- Banin, E., Israely, T., Kushmaro, A., Loya, Y., Orr, E., Rosenberg, E., 2000. Penetration of the coral-bleaching bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3031–3036.

- Banin, E., Khare, S.K., Naider, F., Rosenberg, E., 2001. Proline-rich peptide from the coral pathogen *Vibrio shiloi* that inhibits photosynthesis of zooxanthellae. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1536–1541. [doi:10.1128/AEM.67.4.1536-1541.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1536-1541.2001)
- Banin, E., Vassilakos, D., Orr, E., Martinez, R.J., Rosenberg, E., 2003. Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Curr. Microbiol.* 46, 418–422. [doi:10.1007/s00284-002-3912-5](https://doi.org/10.1007/s00284-002-3912-5)
- Banning, P. van, 1982. Some aspects of the occurrence, importance and control of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* in the Dutch oyster culture. *Invertebr. Pathol. Microb. Control Proc. IIIrd Int. Colloq. Invertebr. Pathol. XVth Annu. Meet. Soc. Invertebr. Pathol.* Sept 6-10 1982 Univ Sussex Brighton UK.
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389. [doi:10.1016/S0166-445X\(00\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00088-6)
- Bardy, S.L., Ng, S.Y.M., Jarrell, K.F., 2003. Prokaryotic motility structures. *Microbiol. Read. Engl.* 149, 295–304. [doi:10.1099/mic.0.25948-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.25948-0)
- Barker, W.H., Gangarosa, E.J., 1974. Food poisoning due to *Vibrio parahaemolyticus*. *Annu. Rev. Med.* 25, 75–81. [doi:10.1146/annurev.me.25.020174.000451](https://doi.org/10.1146/annurev.me.25.020174.000451)
- Beaubrun, J.J.-G., Kothary, M.H., Curtis, S.K., Flores, N.C., Eribo, B.E., Tall, B.D., 2008. Isolation and characterization of *Vibrio tubiashii* outer membrane proteins and determination of a toxR homolog. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 907–911. [doi:10.1128/AEM.02052-07](https://doi.org/10.1128/AEM.02052-07)
- Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J.L., Figueras, M.J., 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 34–43. [doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00135.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00135.x)
- Bechemin, C., Soletchnik, P., Polsenaere, P., Le Moine, O., Pernet, F., Protat, M., Fuhrmann, M., Quere, C., Goulitquer, S., Corporeau, C., Renault, T., Lapegue, S., Travers, M.-A., Morga, B., Garriques, M., Garcia, C., Haffner, P., Dubreuil, C., Faury, N., Baillon, L., Baud, J.-P., 2014. Surmortalités de la moule bleue *Mytilus edulis* dans les Pertuis Charentais (mars 2014).
- Beliaeff, B., O'Connor, T.P., Munschy, C., Raffin, B., Claisse, D., 2002. Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in mussels and oysters in France and the United States. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1783–1787. [doi:10.1002/etc.5620210904](https://doi.org/10.1002/etc.5620210904)
- Ben-Haim, Y., Rosenberg, E., 2002. A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Biol.* 141, 47–55. [doi:10.1007/s00227-002-0797-6](https://doi.org/10.1007/s00227-002-0797-6)
- Ben-Haim, Y., Thompson, F.L., Thompson, C.C., Cnockaert, M.C., Hoste, B., Swings, J., Rosenberg, E., 2003a. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 309–315. [doi:10.1099/ijs.0.02402-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.02402-0)
- Ben-Haim, Y., Zicherman-Keren, M., Rosenberg, E., 2003b. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4236–4242. [doi:10.1128/AEM.69.7.4236-4242.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4236-4242.2003)
- Beninger, P.G., Le Pennec, G., Le Pennec, M., 2003. Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L. *Biol. Bull.* 205, 83–92.

- Bina, X.R., Provenzano, D., Nguyen, N., Bina, J.E., 2008. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect. Immun.* 76, 3595–3605. doi:10.1128/IAI.01620-07
- Binesse, J., Delsert, C., Saulnier, D., Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M., Munier-Lehmann, H., Mazel, D., Le Roux, F., 2008. Metalloprotease vsm is the major determinant of toxicity for extracellular products of *Vibrio splendidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7108–7117. doi:10.1128/AEM.01261-08
- Bisharat, N., Agmon, V., Finkelstein, R., Raz, R., Ben-Dror, G., Lerner, L., Soboh, S., Colodner, R., Cameron, D.N., Wykstra, D.L., Swerdlow, D.L., Farmer, J.J., 1999. Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *Israel Vibrio Study Group. Lancet Lond. Engl.* 354, 1421–1424.
- Black, S.D., Coon, M.J., 1987. P-450 cytochromes: structure and function. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 60, 35–87.
- Boettcher, K.J., Geaghan, K.K., Maloy, A.P., Barber, B.J., 2005. *Roseovarius crassostreae* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1531–1537. doi:10.1099/ijs.0.63620-0
- Boman, H.G., 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 61–92. doi:10.1146/annurev.iy.13.040195.000425
- Bonnafe, E., Sroda, S., Budzinski, H., Valière, A., Pedelluc, J., Marty, P., Geret, F., 2015. Responses of cytochrome P450, GST, and MXR in the mollusk *Corbicula fluminea* to the exposure to hospital wastewater effluents. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 11033–11046. doi:10.1007/s11356-015-4309-x
- Borges-Walmsley, M.I., McKeegan, K.S., Walmsley, A.R., 2003. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J.* 376, 313–338. doi:10.1042/BJ20020957
- Bowdre, J.H., Poole, M.D., Oliver, J.D., 1981. Edema and hemoconcentration in mice experimentally infected with *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 32, 1193–1199.
- Brew, K., Nagase, H., 2010. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Matrix Metalloproteinases* 1803, 55–71. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.003
- Brienne, H., 1964. Observations sur l'infestation des moules du Pertuis Breton par *Mytilicola intestinalis* STEUER. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* 28, 205–230.
- Brienne, H., 1960. *Mytilicola intestinalis* Steuer dans les moules de la baie de l'Aiguillon. *Sci. Pêche* 87, 1–6.
- Bruno, D., Hastings, T., Ellis, A., 1985. Histopathology, bacteriology and experimental transmission of cold-water vibriosis in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Organ.* 1, 163–168. doi:10.3354/dao001163
- Buratti, S., Franzellitti, S., Poletti, R., Ceredi, A., Montanari, G., Capuzzo, A., Fabbri, E., 2013. Bioaccumulation of algal toxins and changes in physiological parameters in Mediterranean mussels from the North Adriatic Sea (Italy). *Environ. Toxicol.* 28, 451–470. doi:10.1002/tox.20739

- Burreson, E.M., Ford, S.E., 2004. A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquat. Living Resour.* 17, 499–517. doi:10.1051/alr:2004056
 - Butt, D., Raftos, D., 2008. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 299–306. doi:10.1016/j.dci.2007.06.006
- C-
- Campos, B., Altenburger, R., Gómez, C., Lacorte, S., Piña, B., Barata, C., Luckenbach, T., 2014. First evidence for toxic defense based on the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 148, 139–151. doi:10.1016/j.aquatox.2014.01.001
 - Cantet, F., Toubiana, M., Parisi, M.-G., Sonthi, M., Cammarata, M., Roch, P., 2012. Individual variability of mytimycin gene expression in mussel. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 641–644. doi:10.1016/j.fsi.2012.06.020
 - Carballal, M., Lopez, C., Azevedo, C., Villalba, A., 1997a. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* 70, 96–105.
 - Carballal, M., López, C., Azevedo, C., Villalba, A., 1997b. In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 7, 403–416. doi:10.1006/fsim.1997.0094
 - Casadevall, A., Pirofski, L., 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* 67, 3703–3713.
 - Casadevall, A., Pirofski, L.-A., 2009. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. *J. Water Health* 7 Suppl 1, S2–S18. doi:10.2166/wh.2009.036
 - Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1996. *Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oysters Los Angeles, 1996. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 45, 621–624.
 - Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1993. *Vibrio vulnificus* infections associated with raw oyster consumption Florida, 1981-1992. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 42, 405–407.
 - Chagot, D., Alzieu, C., Sanjuan, J., Grizel, H., 1990. Sublethal and histopathological effects of trace levels of tributyltin fluoride on adult oysters *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 3, 121–130. doi:10.1051/alr:1990012
 - Chaiyanan, Saipin, Chaiyanan, Sitthipan, Grim, C., Maugel, T., Huq, A., Colwell, R.R., 2007. Ultrastructure of coccoid viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. *Environ. Microbiol.* 9, 393–402. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01150.x
 - Champion, J.A., Mitragotri, S., 2006. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4930–4934. doi:10.1073/pnas.0600997103
 - Chan, K.M., Davies, P.L., Childs, S., Veinot, L., Ling, V., 1992. P-glycoprotein genes in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*: isolation of two types of genomic clones carrying 3' terminal exons. *Biochim. Biophys. Acta* 1171, 65–72.

- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Bulet, P., 1996. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. J. Biol. Chem. 271, 21808–21813.
- Chatterjee, B.P., Adhya, M., 2013. Lectins with varying specificity and biological activity from marine bivalves, in: Kim, S.-K. (Ed.), Marine Proteins and Peptides. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 41–68.
- Chen, H., Zha, J., Yuan, L., Wang, Z., 2015. Effects of fluoxetine on behavior, antioxidant enzyme systems, and multixenobiotic resistance in the Asian clam *Corbicula fluminea*. Chemosphere 119, 856–862. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.08.062
- Chen, Y.-C., Chang, M.-C., Chuang, Y.-C., Jeang, C.-L., 2004. Characterization and virulence of hemolysin III from *Vibrio vulnificus*. Curr. Microbiol. 49, 175–179. doi:10.1007/s00284-004-4288-5
- Cheng, T., Rifkin, E., 1970. Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth parasitism. American Fisheries Society 1970 No.5 pp.443-496
- Cheng, T.C., 1992. Selective induction of release of hydrolases from *Crassostrea virginica* hemocytes by certain bacteria. J. Invertebr. Pathol. 59, 197–200. doi:10.1016/0022-2011(92)90033-Z
- Cheng, T.C., 1986. Specificity and the role of lysosomal hydrolases in molluscan inflammation. Int. J. Tissue React. 8, 439–445.
- Cheng, T.C., 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 266, 343–379. doi:10.1111/j.1749-6632.1975.tb35116.x
- Cheng, T.C., Howland, K.H., 1979. Chemotactic attraction between hemocytes of the oyster, *Crassostrea virginica*, and bacteria. J. Invertebr. Pathol. 33, 204–210. doi:10.1016/0022-2011(79)90154-X
- Chuang, Y.C., Chang, T.M., Chang, M.C., 1997. Cloning and characterization of the gene (empV) encoding extracellular metalloprotease from *Vibrio vulnificus*. Gene 189, 163–168.
- Chufan, E.E., Kapoor, K., Sim, H.-M., Singh, S., Talele, T.T., Durell, S.R., Ambudkar, S.V., 2013. Multiple transport-active binding sites are available for a single substrate on human P-Glycoprotein (ABCB1). PLOS ONE 8, e82463. doi:10.1371/journal.pone.0082463
- Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M., Deeley, R.G., 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science 258, 1650–1654.
- Cole, S.P., Sparks, K.E., Fraser, K., Loe, D.W., Grant, C.E., Wilson, G.M., Deeley, R.G., 1994. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. Cancer Res. 54, 5902–5910.
- Coles, J.A., Pipe, R.K., 1994. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Fish Shellfish Immunol. 4, 337–352. doi:10.1006/fsim.1994.1030
- Colwell, R.R., Grimes, D.J., 1984. *Vibrio* diseases of marine fish populations. Helgoländer Meeresunters. 37, 265–287. doi:10.1007/BF01989311
- Comité National de la Conchyliculture [WWW Document],. CNC. URL <http://www.cnc-france.com/> (accessed 12.20.16).

- Commandeur, J.N., Stijntjes, G.J., Vermeulen, N.P., 1995. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol. Rev.* 47, 271–330.
- Comps, M., 1983. Les infections virales associées aux épizooties des huîtres du genre *Crassostrea*. *Rapp. Procès Verbaux CIEM* 182, 137–139.
- Costa, M.M., Prado-Alvarez, M., Gestal, C., Li, H., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A., 2009. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 515–523.
- Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Tessier, A., Pellerin-Massicotte, J., Auclair, J.C., 1995. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I: Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 690–702.

-D-

- Daily, O.P., Debell, R.M., Joseph, S.W., 1978. Superoxide dismutase and catalase levels in halophilic vibrios. *J. Bacteriol.* 134, 375–380.
- Dalmas, O., Orelle, C., Foucher, A.-E., Geourjon, C., Crouzy, S., Di Pietro, A., Jault, J.-M., 2005. The Q-loop disengages from the first intracellular loop during the catalytic cycle of the multidrug ABC transporter BmrA. *J. Biol. Chem.* 280, 36857–36864. [doi:10.1074/jbc.M503266200](https://doi.org/10.1074/jbc.M503266200)
- Daniels, N.A., MacKinnon, L., Bishop, R., Altekruze, S., Ray, B., Hammond, R.M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N.H., Griffin, P.M., Slutsker, L., 2000. *Vibrio parahaemolyticus* Infections in the United States, 1973–1998. *J. Infect. Dis.* 181, 1661–1666. [doi:10.1086/315459](https://doi.org/10.1086/315459)
- Dassa, E., Bouige, P., 2001. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res. Microbiol.* 152, 211–229. [doi:10.1016/S0923-2508\(01\)01194-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01194-9)
- Davis, J.W., Sizemore, R.K., 1982. Incidence of *Vibrio* species associated with blue crabs (*Callinectes sapidus*) collected from Galveston Bay, Texas. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1092–1097.
- Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R., 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11, 1156–1166. [doi:10.1101/gr.184901](https://doi.org/10.1101/gr.184901)
- Delgado, Carrasco, Elandalousi, Roque, 2007. A mortality event of the venerid bivalve *Callista chione* (Linnaeus, 1758) in a hatchery system - A case study. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 27(6) 214–223.
- Della Torre, C., Bocci, E., Focardi, S.E., Corsi, I., 2014. Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Mar. Environ. Res.* 93, 56–63. [doi:10.1016/j.marenvres.2013.06.005](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.06.005)
- Depaola, A., 1981. *Vibrio cholerae* in marine foods and environmental waters: a literature review. *J. Food Sci.* 46, 66–70. [doi:10.1111/j.1365-2621.1981.tb14532.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb14532.x)

- Diggles, B.K., Carson, J., Hine, P.M., Hickman, R.W., Tait, M.J., 2000. *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium nudipinnis*) and brill (*C. guntheri*) in New Zealand. *Aquaculture* 183, 1–12. doi:10.1016/S0044-8486(99)00280-X
- Donaghy, L., Hong, H.-K., Jauzein, C., Choi, K.-S., 2015. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 91–97. doi:10.1016/j.fsi.2014.10.030
- Donaghy, L., Kraffe, E., Goïc, N.L., Lambert, C., Volety, A.K., Soudant, P., 2012. Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* : a mitochondrial involvement. *PLOS ONE* 7, e46594. doi:10.1371/journal.pone.0046594
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., Ross, D.D., 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15665–15670.
- Duperthuy, M., Binesse, J., Le Roux, F., Romestand, B., Caro, A., Got, P., Givaudan, A., Mazel, D., Bachère, E., Destoumieux-Garzón, D., 2010. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ. Microbiol.* 12, 951–963. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02138.x
- Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzón, E., Caro, A., Rosa, R.D., Le Roux, F., Lautrédou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., de Lorgeril, J., Kieffer-Jaquinod, S., Bachère, E., Destoumieux-Garzón, D., 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2993–2998. doi:10.1073/pnas.1015326108
- Dziarski, R., Gupta, D., 2006. The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.* 7, 232. doi:10.1186/gb-2006-7-8-232

-E-

- Egidius, E., Wiik, R., Andersen, K., Hoff, K.A., Hjeltne, B., 1986. *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 36, 518–520. doi:10.1099/00207713-36-4-518
- El Bour, M., Dellali, M., Boukef, I., Lakhal, F., Mraoua, R., El Hili, H.A., Paillard, C., Klena, J., 2012. First assessment of Perkinsosis and brown ring disease co-infection in *Ruditapes decussatus* in the North Lake of Tunis (southern Mediterranean Sea). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 92, 1579–1584. doi:10.1017/S0025315411001846
- El Bour, M., Jaafar-Kefi, F., Hamrouni, M., Mahmoudi, N., Dellali, M., Trigui El Menif, N., Aloui-Bejaoui, N., 2008. Dépistage de la maladie de l’anneau brun chez des espèces de bivalves des côtes tunisiennes. *Bull. Société Zool. Fr.* 133, 107–115.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516. doi:10.1080/01926230701320337
- Elston, R.A., Wilkinson, M.T., 1985. Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease (OVVD). *Aquaculture* 48, 189–210. doi:10.1016/0044-8486(85)90124-3

- Encyclopædia Britannica, 2016. bivalve | class of mollusks | Britannica.com [WWW Document]. URL <https://global.britannica.com/animal/bivalve> (accessed 10.4.16).
- Eufemia, N., 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. Amst. Neth.* 49, 89–100.
- Evers, R., Kool, M., van Deemter, L., Janssen, H., Calafat, J., Oomen, L.C., Paulusma, C.C., Oude Elferink, R.P., Baas, F., Schinkel, A.H., Borst, P., 1998. Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J. Clin. Invest.* 101, 1310–1319. doi:10.1172/JCI119886
- F-
- Fabbri, A., Falzano, L., Frank, C., Donelli, G., Matarrese, P., Raimondi, F., Fasano, A., Fiorentini, C., 1999. *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin modulates cytoskeletal organization and calcium homeostasis in intestinal cultured cells. *Infect. Immun.* 67, 1139–1148.
- Faisal, M., MacIntyre, E.A., Adham, K.G., Tall, B.D., Kothary, M.H., La Peyre, J.F., 1998. Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 121, 161–168. doi:10.1016/S0305-0491(98)10084-6
- Fang, F.C., 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 820–832. doi:10.1038/nrmicro1004
- Faria, M., Navarro, A., Luckenbach, T., Piña, B., Barata, C., 2011. Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 101, 78–87. doi:10.1016/j.aquatox.2010.09.004
- Faria, M., Pavlichenko, V., Burkhardt-Medicke, K., Soares, A.M.V.M., Altenburger, R., Barata, C., Luckenbach, T., 2016. Use of a combined effect model approach for discriminating between ABCB1- and ABCC1-type efflux activities in native bivalve gill tissue. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 297, 56–67. doi:10.1016/j.taap.2016.02.020
- Farto, R., Armada, S.P., Montes, M., Guisande, J.A., Pérez, M.J., Nieto, T.P., 2003. *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *J. Invertebr. Pathol.* 83, 149–156.
- Feng, S.Y., Feng, J.S., Burke, C.N., Khairallah, L.H., 1971. Light and electron microscopy of the leucocytes of *Crassostrea virginica* (Mollusca: Pelecypoda). *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria* 1948 120, 222–245.
- Ferreira, M., Costa, J., Reis-Henriques, M.A., 2014. ABC transporters in fish species: a review. *Front. Physiol.* 5. doi:10.3389/fphys.2014.00266
- Finkelstein, R., Edelstein, S., Mahamid, G., 2002. Fulminant wound infections due to *Vibrio vulnificus*. *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ* 4, 654–655.
- Finkelstein, R.A., 1996. Cholera, *Vibrio cholerae* O1 and O139, and other pathogenic vibrios, in: baron, s. (ed.), medical microbiology. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).

- Fischer, S., Klüver, N., Burkhardt-Medicke, K., Pietsch, M., Schmidt, A.-M., Wellner, P., Schirmer, K., Luckenbach, T., 2013. Abcb4 acts as multixenobiotic transporter and active barrier against chemical uptake in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. BMC Biol. 11, 69. doi:10.1186/1741-7007-11-69
- Fisson, C., Leboulenger, F., Lecarpentier, T., Moussard, S., Ranvier, G., 2014. L'estuaire de la Seine : état de santé et évolution. Fascicule Seine -Aval 31 48p.
- Foster, J.S., Apicella, M.A., McFall-Ngai, M.J., 2000. *Vibrio fischeri* lipopolysaccharide induces developmental apoptosis, but not complete morphogenesis, of the *Euprymna scolopes* symbiotic light organ. Dev. Biol. 226, 242–254. doi:10.1006/dbio.2000.9868
- Frans, I., Michiels, C.W., Bossier, P., Willems, K.A., Lievens, B., Rediers, H., 2011. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. J. Fish Dis. 34, 643–661. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x
- Franzellitti, S., Fabbri, E., 2013. Cyclic-AMP mediated regulation of ABCB mRNA expression in mussel haemocytes. PLoS ONE 8, e61634. doi:10.1371/journal.pone.0061634
- Franzellitti, S., Striano, T., Valbonesi, P., Fabbri, E., 2016. Insights into the regulation of the MXR response in haemocytes of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). Fish Shellfish Immunol. 58, 349–358. doi:10.1016/j.fsi.2016.09.048
- Friedman, C.S., Hedrick, R.P., 1991. Pacific oyster nocardiosis: Isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. J. Invertebr. Pathol. 57, 109–120. doi:10.1016/0022-2011(91)90047-T

-G-

- Ganz, T., 2003. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. Integr. Comp. Biol. 43, 300–304. doi:10.1093/icb/43.2.300
- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M., Nicolas, J.-L., 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Microb. Ecol. 53, 187–196. doi:10.1007/s00248-006-9061-9
- Gay, M., Renault, T., Pons, A.-M., Le Roux, F., 2004. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. Dis. Aquat. Organ. 62, 65–74. doi:10.3354/dao062065
- Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., van der Ploeg, M., van de Zee, S.E.A.T.M., Ritsema, C.J., 2015. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. Int. Soil Water Conserv. Res. 3, 57–65. doi:10.1016/j.iswcr.2015.03.002
- Geiszt, M., Leto, T.L., 2004. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. J. Biol. Chem. 279, 51715–51718. doi:10.1074/jbc.R400024200
- Genard, B., Miner, P., Nicolas, J.-L., Moraga, D., Boudry, P., Pernet, F., Tremblay, R., 2013. Integrative study of physiological changes associated with bacterial infection in Pacific oyster larvae. PLOS ONE 8, e64534. doi:10.1371/journal.pone.0064534
- Gerdol, M., De Moro, G., Manfrin, C., Venier, P., Pallavicini, A., 2012. Big defensins and mytimacins, new AMP families of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Dev. Comp. Immunol. 36, 390–399. doi:10.1016/j.dci.2011.08.003

- Gestal, C., Roch, P., Renault, T., Pallavicini, A., Paillard, C., Novoa, B., Oubella, R., Venier, P., Figueras, A., 2008. Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics. *Rev. Fish. Sci.* 16, 133–156. doi:10.1080/10641260802325518
- Gilroy, E.A.M., Klinck, J.S., Campbell, S.D., McInnis, R., Gillis, P.L., de Solla, S.R., 2014. Toxicity and bioconcentration of the pharmaceuticals moxifloxacin, rosuvastatin, and drospirenone to the unionid mussel *Lampsilis siliquoidea*. *Sci. Total Environ.* 487, 537–544. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.03.051
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S., 2006a. “Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* 253, 105–113. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.07.031
- Goarant, C., Herlin, J., Brizard, R., Marteau, A.L., Martin, C., Martin, B., 2000. Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Dis. Aquat. Organ.* 40, 101–107. doi:10.3354/dao040101
- Goarant, C., Reynaud, Y., Ansquer, D., Decker, S. de, Saulnier, D., Roux, F. le, 2006b. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 570–580. doi:10.1016/j.syapm.2005.12.005
- Goedken, M., De Guise, S., 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 539–552. doi:10.1016/j.fsi.2003.09.009
- Gomez-Gil, B., Thompson, C.C., Matsumura, Y., Sawabe, Toko, Iida, T., Christen, R., Thompson, F., Sawabe, Tomoo, 2014. The Family Vibrionaceae, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 659–747. doi:10.1007/978-3-642-38922-1_225
- Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M.L., Novoa, B., Figueras, A., 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 98–104. doi:10.1128/AEM.71.1.98-104.2005
- Goo, S.Y., Lee, Hyun-Ju, Kim, W.H., Han, K.-L., Park, D.-K., Lee, Hyun-Jung, Kim, S.M., Kim, K.-S., Lee, K.-H., Park, S.-J., 2006. Identification of OmpU of *Vibrio vulnificus* as a fibronectin-binding protein and its role in bacterial pathogenesis. *Infect. Immun.* 74, 5586–5594. doi:10.1128/IAI.00171-06
- Gopal, S., Otta, S.K., Kumar, S., Karunasagar, Indrani, Nishibuchi, M., Karunasagar, Iddya, 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 151–159. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.011
- Gosling, E., 2015. *Marine Bivalve Molluscs*. John Wiley & Sons.
- Gosling, E., 2008. *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*. John Wiley & Sons.
- Gottesman, M.M., Ling, V., 2006. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. *FEBS Lett.* 580, 998–1009. doi:10.1016/j.febslet.2005.12.060
- Gourdon, I., Guérin, M.-C., Torreilles, J., Roch, P., 2001. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide* 5, 1–6. doi:10.1006/niox.2000.0327

- Gravato, C., Oliveira, M., Santos, M.A., 2005. Oxidative stress and genotoxic responses to resin acids in Mediterranean mussels. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 221–229. [doi:10.1016/j.ecoenv.2004.12.017](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.12.017)
- Grisez, L., Chair, M., Sorgeloos, P., Ollevier, F., 1996. Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. *Dis. Aquat. Organ.* 26, 181–187. [doi:10.3354/dao026181](https://doi.org/10.3354/dao026181)
- Grizel, H., Comps, M., Bonami, J.-R., Cousserans, F., Duthoit, J.-L., Le Pennec, M.-A., 1974. Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Sci. Pêche* 7–30.
- Guan, L.L., Kanoh, K., Kamino, K., 2001. Effect of exogenous siderophores on iron uptake activity of marine bacteria under iron-limited conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1710–1717. [doi:10.1128/AEM.67.4.1710-1717.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1710-1717.2001)
- Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguière, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachère, E., Escoubas, J.M., 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303, 139–145.
- Guentzel, M.N., Berry, L.J., 1975. Motility as a virulence factor for *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 11, 890–897.
- Guichard, B., Francois, C., Joly, J.-P., Garcia, C., Saulnier, D., Pepin, J.-F., Arzul, I., Omnes, E., Tourbiez, D., Faury, N., Haffner, P., Chollet, B., Robert, M., Renault, T., Rauflet, F., Le Gagneur, E., Ropert, M., Mouillard, G., Gerla, D., Annezo, J.-P., Le Gal, D., Langlade, A., Bedier, E., Brerette, S., Chabirand, J.-M., Grizon, J., Robert, S., Courtois, O., Rumebe, M., Cantin, C., 2011. Bilan 2010 du réseau Repamo - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins.
- Guisande, J.A., Montes, M., Farto, R., Armada, S.P., Pérez, M.J., Nieto, T.P., 2004. A set of tests for the phenotypic identification of culturable bacteria associated with Galician bivalve mollusc production. *Journal of Shellfish Research* 23(2):599-609

-H-

- Ham, H., Orth, K., 2012. The role of type III secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity. *J. Microbiol. Seoul Korea* 50, 719–725. [doi:10.1007/s12275-012-2550-2](https://doi.org/10.1007/s12275-012-2550-2)
- Hamdoun, A.M., Griffin, F.J., Cherr, G.N., 2002. Tolerance to biodegraded crude oil in marine invertebrate embryos and larvae is associated with expression of a multixenobiotic resistance transporter. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 61, 127–140.
- Hansen, G.H., Olafsen, J.A., 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microb. Ecol.* 38, 1–26.
- Heidelberg, J.F., Heidelberg, K.B., Colwell, R.R., 2002. Bacteria of the gamma-subclass Proteobacteria associated with zooplankton in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5498–5507.
- Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 433–440. [doi:10.1016/j.fsi.2006.06.014](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.06.014)

- Hibbetts, K., Hines, B., Williams, D., 1999. An overview of proteinase inhibitors. J. Vet. Intern. Med. Am. Coll. Vet. Intern. Med. 13, 302–308.
- Higgins, C.F., Linton, K.J., 2004. The ATP switch model for ABC transporters. Nat. Struct. Mol. Biol. 11, 918–926. doi:10.1038/nsmb836
- Hilbish, T., Carson, E., Plante, J., Weaver, L., Gilg, M., 2002. Distribution of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and their hybrids in open-coast populations of mussels in southwestern England. Mar. Biol. 140, 137–142. doi:10.1007/s002270100631
- Hlady, W.G., Klontz, K.C., 1996. The Epidemiology of *Vibrio* Infections in Florida, 1981–1993. J. Infect. Dis. 173, 1176–1183. doi:10.1093/infdis/173.5.1176
- Honda, T., Ni, Y., Miwatani, T., Adachi, T., Kim, J., 1992. The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin. Can. J. Microbiol. 38, 1175–1180.
- Horseman, M.A., Surani, S., 2011. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. Int. J. Infect. Dis. 15, e157–e166. doi:10.1016/j.ijid.2010.11.003
- Horwitz, M.A., 1983. The Legionnaires’ disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. J. Exp. Med. 158, 2108–2126.
- Howe, A.K., 2004. Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Cell Adhesion and Signalling 1692, 159–174. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.03.005
- Huang, L., Liu, S.-L., Zheng, J.-W., Li, H.-Y., Liu, J.-S., Yang, W.-D., 2015. P-glycoprotein and its inducible expression in three bivalve species after exposure to *Prorocentrum lima*. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 169, 123–132. doi:10.1016/j.aquatox.2015.10.012
- Huang, L., Wang, J., Chen, W.-C., Li, H.-Y., Liu, J.-S., Jiang, T., Yang, W.-D., 2014. P-glycoprotein expression in *Perna viridis* after exposure to *Prorocentrum lima*, a dinoflagellate producing DSP toxins. Fish Shellfish Immunol. 39, 254–262. doi:10.1016/j.fsi.2014.04.020
- Hubert, F., Cooper, E.L., Roch, P., 1997. Structure and differential target sensitivity of the stimutable cytotoxic complex from hemolymph of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Biochim. Biophys. Acta 1361, 29–41.
- Hubert, F., Noel, T., Roch, P., 1996. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Eur. J. Biochem. FEBS 240, 302–306.
- Huffman, J.E., Tripp, M.R., 1982. Cell types and hydrolytic enzymes of soft shell clam (*Mya arenaria*) hemocytes. J. Invertebr. Pathol. 40, 68–74. doi:10.1016/0022-2011(82)90038-6
- Huggett, R.J., 1992. Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers.

-I-

- INRS, 2007. Benzo[a]pyrène (FT 144) - Fiche toxicologique - [WWW Document]. URL <http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/> (accessed 12.21.16).

- Ishimaru, K., Akagawa-Matsushita, M., Muroga, K., 1996. *Vibrio ichthyoenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) Larvae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 46, 155–159. doi:10.1099/00207713-46-1-155
- Itoh, N., Takahashi, K.G., 2008. Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 150, 409–417. doi:10.1016/j.cbpb.2008.04.011
- Iwamoto, Y., Suzuki, Y., Kurita, A., Watanabe, Y., Shimizu, T., Ohgami, H., Yanagihara, Y., 1995. *Vibrio trachuri* sp. nov., a new species isolated from diseased Japanese horse mackerel. Microbiol. Immunol. 39, 831–837.

-J-

- Jakobi, S.G.H., Ribeiro, C.A.O., Burckhardt, P.L., Oliveira, L.T., Pessatti, M.L., 2012. Chemosensitizer effect of the crude oil water-soluble fraction on multixenobiotic resistance mechanism of the mussel *Perna perna* exposed to tributyltin. Braz. J. Aquat. Sci. Technol. 16, 69–77.
- Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E., 2010. Phase II drug metabolizing enzymes. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacký Olomouc Czechoslov. 154, 103–116.
- Jayasree, L., Janakiram, P., Madhavi, R., 2006. Characterization of *Vibrio* spp. Associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). J. World Aquac. Soc. 37, 523–532. doi:10.1111/j.1749-7345.2006.00066.x
- Jeffries, V.E., 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Aquaculture 29, 201–226. doi:10.1016/0044-8486(82)90136-3
- Johansson, M.W., Lind, M.I., Holmblad, T., Thörnqvist, P.O., Söderhäll, K., 1995. Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood. Biochem. Biophys. Res. Commun. 216, 1079–1087. doi:10.1006/bbrc.1995.2731
- Johnson, J.A., Panigrahi, P., Morris, J.G., 1992. Non-O1 *Vibrio cholerae* NRT36S produces a polysaccharide capsule that determines colony morphology, serum resistance, and virulence in mice. Infect. Immun. 60, 864–869.
- Johnstone, M.B., Ellis, S., Mount, A.S., 2008. Visualization of shell matrix proteins in hemocytes and tissues of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol. 310, 227–239. doi:10.1002/jez.b.21206
- Jones, J., Scotti, P., Dearing, S., Wesney, B., 1996. Virus-like particles associated with marine mussel mortalities in New Zealand. Dis. Aquat. Organ. 25, 143–149. doi:10.3354/dao025143
- Jones, M.K., Oliver, J.D., 2009. *Vibrio vulnificus*: Disease and pathogenesis. Infect. Immun. 77, 1723–1733. doi:10.1128/IAI.01046-08
- Jordão, R., Campos, B., Lemos, M.F.L., Soares, A.M.V.M., Tauler, R., Barata, C., 2016. Induction of multixenobiotic defense mechanisms in resistant *Daphnia magna* clones as a general cellular response to stress. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 175, 132–143. doi:10.1016/j.aquatox.2016.03.015

-K-

- Kabir, S., 1982. Characterization of the lipopolysaccharide from *Vibrio cholerae* 395 (Ogawa). Infect. Immun. 38, 1263–1272.
- Kamel, N., Burgeot, T., Banni, M., Chalghaf, M., Devin, S., Minier, C., Boussetta, H., 2014. Effects of increasing temperatures on biomarker responses and accumulation of hazardous substances in rope mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Bizerte lagoon. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 21, 6108–6123. doi:10.1007/s11356-014-2540-5
- Kathawala, R.J., Gupta, P., Ashby, C.R., Chen, Z.-S., 2015. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother. 18, 1–17. doi:10.1016/j.drug.2014.11.002
- Kaufman, G.E., Myers, M.L., Pass, C.L., Bej, A.K., Kaysner, C.A., 2002. Molecular analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from human patients and shellfish during US Pacific north-west outbreaks. Lett. Appl. Microbiol. 34, 155–161.
- Keppler, C., Ringwood, A.H., 2001. Expression of P-glycoprotein in southeastern oysters, *Crassostrea virginica*. Mar. Environ. Res. 52, 81–96. doi:10.1016/S0141-1136(00)00263-4
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L., 2009. Two pathogens of Greenshell mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius*-like isolate. J. Fish Dis. 32, 499–507. doi:10.1111/j.1365-2761.2009.01006.x
- Kilpatrick, D.C., 2002. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. Transfus. Med. Oxf. Engl. 12, 335–352.
- Kim, S.H., Sharma, R.P., 2004. Mercury-induced apoptosis and necrosis in murine macrophages: role of calcium-induced reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase signaling. Toxicol. Appl. Pharmacol. 196, 47–57. doi:10.1016/j.taap.2003.11.020
- Kim, Y.W., Lee, S.H., Hwang, I.G., Yoon, K.S., 2012. Effect of Temperature on Growth of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Flounder, Salmon Sashimi and Oyster Meat. Int. J. Environ. Res. Public Health 9, 4662–4675. doi:10.3390/ijerph9124662
- Kimchi-Sarfaty, C., Gribar, J.J., Gottesman, M.M., 2002. Functional characterization of coding polymorphisms in the human *mdr1* gene using a vaccinia virus expression system. Mol. Pharmacol. 62, 1–6. doi:10.1124/mol.62.1.1
- Kingtong, S., Chitramvong, Y., Janvilisri, T., 2007. ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. Aquat. Toxicol. 85, 124–132. doi:10.1016/j.aquatox.2007.08.006
- Klontz, K.C., Lieb, S., Schreiber, M., Janowski, H.T., Baldy, L.M., Gunn, R.A., 1988. Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections. Clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981–1987. Ann. Intern. Med. 109, 318–323.
- Kochut, A., Dersch, P., 2013. Bacterial invasion factors: tools for crossing biological barriers and drug delivery? Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV 84, 242–250. doi:10.1016/j.ejpb.2012.11.013

- Köhler, A., Lauritzen, B., Jansen, D., Böttcher, P., Teguliwa, L., Krüner, G., Broeg, K., 1998. Detection of P-glycoprotein mediated MDR/MXR in *Caranus maenas* hepatopancreas by immuno-gold-silver labeling. Mar. Environ. Res., Pollutant Responses in Marine Organisms 46, 411–414. doi:10.1016/S0141-1136(97)00069-X
- Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., van Eijk, M.J., Juijn, J.A., Baas, F., Borst, P., 1997. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. Cancer Res. 57, 3537–3547.
- Krantz, G.E., Colwell, R.R., Lovelace, E., 1969. *Vibrio parahaemolyticus* from the blue crab *Callinectes sapidus* in Chesapeake Bay. Science 164, 1286–1287.
- Krukonis, E.S., DiRita, V.J., 2003. From motility to virulence: sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. Curr. Opin. Microbiol. 6, 186–190. doi:10.1016/S1369-5274(03)00032-8
- Kumar, A., Shukla, Suneet, Mandal, A., Shukla, Sudhanshu, Ambudkar, S.V., Prasad, R., 2010. Divergent signature motifs of nucleotide binding domains of ABC multidrug transporter, CaCdr1p of pathogenic *Candida albicans*, are functionally asymmetric and noninterchangeable. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1798, 1757–1766. doi:10.1016/j.bbamem.2010.05.017
- Kurelec, B., 1995. Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences. Sci. Total Environ., Environmental toxicology: hazards to the environment and man in the Mediterranean region 171, 197–204. doi:10.1016/0048-9697(95)04689-4
- Kurelec, B., 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. Crit. Rev. Toxicol. 22, 23–43. doi:10.3109/10408449209145320
- Kurelec, B., Krča, S., Lucić, D., 1996. Expression of multixenobiotic resistance mechanism in a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of exposure to polluted environments. Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 113, 283–289. doi:10.1016/0742-8413(96)84525-7
- Kurelec, B., Krca, S., Pivcevic, B., Ugarković, D., Bachmann, M., Imsiecke, G., Müller, W.E., 1992. Expression of P-glycoprotein gene in marine sponges. Identification and characterization of the 125 kDa drug-binding glycoprotein. Carcinogenesis 13, 69–76.
- Kurelec, B., Pivcević, B., 1989. Distinct glutathione-dependent enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a fresh-water mussel *Anodonta cygnea*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 164, 934–940.
- Kushmaro, A., Banin, E., Loya, Y., Stackebrandt, E., Rosenberg, E., 2001. *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1383–1388. doi:10.1099/00207713-51-4-1383
- Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M., Haim, Y.B., Loya, Y., 1998. Effect of temperature on bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1. Mar. Ecol. Prog. Ser. 171, 131–137. doi:10.3354/meps171131
- Kwan, T.N., Bolch, C.J.S., 2015. Genetic diversity of culturable *Vibrio* in an Australian blue mussel *Mytilus galloprovincialis* hatchery. Dis. Aquat. Organ. 116, 37–46. doi:10.3354/dao02905

-L-

- La Peyre, J.F., Chu, F.-L.E., Meyers, J.M., 1995. Haemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. Fish Shellfish Immunol. 5, 179–190. doi:10.1016/S1050-4648(05)80012-9
- Labreuche, Y., Le Roux, F., Henry, J., Zatylny, C., Huvet, A., Lambert, C., Soudant, P., Mazel, D., Nicolas, J.-L., 2010. *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. Fish Shellfish Immunol. 29, 753–758. doi:10.1016/j.fsi.2010.07.007
- Labreuche, Y., Soudant, P., Gonçalves, M., Lambert, C., Nicolas, J.-L., 2006. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. Dev. Comp. Immunol. 30, 367–379. doi:10.1016/j.dci.2005.05.003
- Lacoste, A., Cueff, A., Poulet, S.A., 2002. P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate beta-adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cells. J. Cell Sci. 115, 761–768.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M., Poulet, S.A., 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). Dis. Aquat. Organ. 46, 139–145. doi:10.3354/dao046139
- Lago, E.P., Nieto, T.P., Farto Seguí, R., 2009. Fast detection of *Vibrio* species potentially pathogenic for mollusc. Vet. Microbiol. 139, 339–346. doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.035
- Lambert, C., 1998. Etude des infections à Vibrionaceae chez les mollusques bivalves à partir d'un modèle larves de *Pecten maximus*. UEB - Université européenne de Bretagne
- Lambert, C., Nicolas, J.L., Cilia, V., 1999. *Vibrio splendidus*-related strain isolated from brown deposit in scallop (*Pecten maximus*) cultured in Brittany (France). Bull Eur Fish Pathol 102.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. Fish Shellfish Immunol. 15, 225–240.
- Le Foll, F., Rioult, D., Boussa, S., Pasquier, J., Dagher, Z., Leboulenger, F., 2010. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. Fish Shellfish Immunol. 28, 372–386. doi:10.1016/j.fsi.2009.11.011
- Le Gall, G., Bachère, E., Mialhe, E., 1991. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific *Rickettsiales-like* organisms. Dis. Aquat. Org. 11, 181–186.
- Le Roux, F., Binesse, J., Saulnier, D., Mazel, D., 2007. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene vsm by use of a novel counterselectable suicide vector. Appl. Environ. Microbiol. 73, 777–784. doi:10.1128/AEM.02147-06
- Lecointre, G., Guyader, H.L., 2001. Classification phylogénétique du vivant. Belin.
- Lee, B.C., Choi, S.H., Kim, T.S., 2008. *Vibrio vulnificus* RTX toxin plays an important role in the apoptotic death of human intestinal epithelial cells exposed to *Vibrio vulnificus*. Microbes Infect. Inst. Pasteur 10, 1504–1513. doi:10.1016/j.micinf.2008.09.006

- Lee, R.D., Jospin, G., Lang, J.M., Eisen, J.A., Coil, D.A., 2016. Draft genome sequences of two *Vibrio splendidus* strains, isolated from seagrass sediment. *Genome Announc.* 4, e01769-15. doi:10.1128/genomeA.01769-15
- Lee, R.J., Younger, A.D., 2002. Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. *Int. Biodeterior. Biodegrad., Risk Assessment* 50, 177–183. doi:10.1016/S0964-8305(02)00084-7
- Lemire, A., Goudenège, D., Versigny, T., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y., Le Roux, F., 2015. Populations, not clones, are the unit of *Vibrio* pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J.* 9, 1523–1531. doi:10.1038/ismej.2014.233
- Leschziner, G., Zabaneh, D., Pirmohamed, M., Owen, A., Rogers, J., Coffey, A.J., Balding, D.J., Bentley, D.B., Johnson, M.R., 2006. Exon sequencing and high resolution haplotype analysis of ABC transporter genes implicated in drug resistance. *Pharmacogenet. Genomics* 16, 439–450. doi:10.1097/01.fpc.0000197467.21964.67
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 216–237. doi:10.1016/j.taap.2004.10.012
- Li, J., Lim, M.S., Li, S., Brock, M., Pique, M.E., Woods, V.L., Craig, L., 2008. *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus structure analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Struct. Lond. Engl.* 1993 16, 137–148. doi:10.1016/j.str.2007.10.027
- Li, T.W., Ding, M.J., Zhang, J., Xiang, J.H., Liu, R.Y., 1998. Studies on the pustule disease of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast. *Journal of Shellfish Research* 17(3):707-711
- Liao, Z., Wang, X., Liu, H., Fan, M., Sun, J., Shen, W., 2013. Molecular characterization of a novel antimicrobial peptide from *Mytilus coruscus*. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 610–616. doi:10.1016/j.fsi.2012.11.030
- Limtrakul, P., 2007. Curcumin as chemosensitizer, in: Aggarwal, B.B., Surh, Y.-J., Shishodia, S. (Eds.), *The Molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease, advances in experimental medicine and biology*. Springer US, pp. 269–300. doi:10.1007/978-0-387-46401-5_12
- Lin, J., Huang, S., Zhang, Q., 2002. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 4, 325–331.
- Lin, W., Fullner, K.J., Clayton, R., Sexton, J.A., Rogers, M.B., Calia, K.E., Calderwood, S.B., Fraser, C., Mekalanos, J.J., 1999. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1071–1076.
- Linton, K.J., 2007. Structure and function of ABC transporters. *Physiology* 22, 122–130. doi:10.1152/physiol.00046.2006
- Linton, K.J., Higgins, C.F., 2007. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 453, 555–567. doi:10.1007/s00424-006-0126-x
- Livingstone, D.R., Nasci, C., Solé, M., Da Ros, L., O'Hara, S.C.M., Peters, L.D., Fossato, V., Wootton, A.N., Goldfarb, P.S., 1997. Apparent induction of a cytochrome P450 with immunochemical similarities to CYP1A in digestive gland of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) with exposure to 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl and Arochlor 1254. *Aquat. Toxicol.* 38, 205–224. doi:10.1016/S0166-445X(96)00847-8

- Lodeiros, C., Bolinches, J., Dopazo, C.P., Toranzo, A.E., 1987. Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* 65, 15–29. doi:10.1016/0044-8486(87)90267-5
- Loo, T.W., Clarke, D.M., 1999. Determining the structure and mechanism of the human multidrug resistance P-glycoprotein using cysteine-scanning mutagenesis and thiol-modification techniques. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 315–325.
- Luckenbach, T., Altenburger, R., Epel, D., 2008. Teasing apart activities of different types of ABC efflux pumps in bivalve gills using the concepts of independent action and concentration addition. *Mar. Environ. Res.* 66, 75–76. doi:10.1016/j.marenvres.2008.02.027
- Luckenbach, T., Epel, D., 2008. ABCB- and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R1919–R1929. doi:10.1152/ajpregu.00563.2007
- Luckenbach, T., Fischer, S., Sturm, A., 2014. Current advances on ABC drug transporters in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 165, 28–52. doi:10.1016/j.cbpc.2014.05.002
- 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. doi:10.1016/j.aquatox.2004.03.003
- Luedeking, A., Koehler, A., 2002. Identification of six mRNA sequences of genes to multixenobiotic resistance (MXR) and biotransformation in *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol.-Prog. Ser. - Mar Ecol-Progr Ser* 238, 115–124. doi:10.3354/meps238115
- Luedeking, A., Van Noorden Cornelis J. F., Koehler A., 2005. Identification and characterisation of a multidrug resistance-related protein mRNA in the blue mussel *Mytilus edulis*

-M-

- Mao, H., Wang, D.-H., Yang, W.-X., 2012. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat. Toxicol.* 110–111, 208–213. doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.018
- Mao, Q., Unadkat, J.D., 2005. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J.* 7, E118–133. doi:10.1208/aapsj070112
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56, 358–392. doi:10.1002/jemt.10040
- Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D., Rey-Alvarez, C., Pousa, A., 2005. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1319–1320. doi:10.3201/eid1108.050322
- Mason, C.F., 2002. *Biology of Freshwater Pollution*. Pearson Education.
- Mateo, D.R., Greenwood, S.J., Araya, M.T., Berthe, F.C.J., Johnson, G.R., Siah, A., 2010. Differential gene expression of γ -actin, Toll-like receptor 2 (TLR-2) and interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4) in *Mya arenaria* haemocytes induced by *in vivo* infections with two *Vibrio splendidus* strains. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 710–714. doi:10.1016/j.dci.2010.02.006

- Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H.-C., Depaola, A., Kim, Y.B., Albert, M.J., Nishibuchi, M., 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed pcr and toxrs sequence analyses. *J. Clin. Microbiol.* 38, 578–585.
- McCarter, L., 1999. The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 51–57.
- McFadzen, I., Eufemia, N., Heath, C., Epel, D., Moore, M., Lowe, D., 2000. Multidrug resistance in the embryos and larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* 50, 319–323.
- Mearns, A.J., Reish, D.J., Oshida, P.S., Ginn, T., Rempel-Hester, M.A., Arthur, C., Rutherford, N., Pryor, R., 2015. Effects of pollution on marine organisms. *Water Environ. Res. Res. Publ. Water Environ. Fed.* 87, 1718–1816. doi:10.2175/106143015X14338845156380
- Mersni Achour, R., 2014. *Vibrio tubiashii* en France: description d'isolats pathogènes affectant des mollusques et étude de leurs mécanismes de virulence. Université de La Rochelle, Ecole doctorale Gay-Lussac.
- Mersni-Achour, R., Imbert-Auvray, N., Huet, V., Ben Cheikh, Y., Fauray, N., Doghri, I., Rouatbi, S., Bordenave, S., Travers, M.-A., Saulnier, D., Fruitier-Arnaudin, I., 2014. First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: II. Characterization of properties of the proteolytic fraction of extracellular products. *J. Invertebr. Pathol.* 123, 49–59. doi:10.1016/j.jip.2014.09.006
- Metzger, M.J., Reinisch, C., Sherry, J., Goff, S.P., 2015. Horizontal transmission of clonal cancer cells causes leukemia in soft-shell clams. *Cell* 161, 255–263. doi:10.1016/j.cell.2015.02.042
- Miao, J., Cai, Y., Pan, L., Li, Z., 2014. Molecular cloning and characterization of a MXR-related P-glycoprotein cDNA in scallop *Chlamys farreri*: transcriptional response to benzo(a)pyrene, tetrabromobisphenol A and endosulfan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 110, 136–142. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.08.029
- Michel, X., Salaün, J.-P., Galgani, F., Narbonne, J.-F., 1994. Benzo(a)pyrene hydroxylase activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: a potential marker of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbon-type compounds. *Mar. Environ. Res.* 38, 257–273. doi:10.1016/0141-1136(94)90027-2
- Michel, X.R., Suteau, P., Robertson, L.W., Narbonne, J.-F., 1993. Effects of benzo(a)pyrene, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on the xenobiotic-metabolizing enzymes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquat. Toxicol.* 27, 335–344. doi:10.1016/0166-445X(93)90062-6
- Milton, D.L., O'Toole, R., Horstedt, P., Wolf-Watz, H., 1996. Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* 178, 1310–1319.
- Minier, C., Abarnou, A., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A.-M., Tutundjian, R., Bocquené, G., Leboulenger, F., 2006. A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 25, 112–119.
- Minier, C., Akcha, F., Galgani, F., 1993. P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 106, 1029–1036. doi:10.1016/0305-0491(93)90068-G

- 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. doi:10.1016/S0166-445X(99)00104-6
- Minier, C., Eufemia, N., Epel, D., 1999. The multi-xenobiotic resistance phenotype as a tool to biomonitor the environment. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 4, 442–454. doi:10.1080/135475099230606
- Minier, C., Forget-Leray, J., Bjørnstad, A., Camus, L., 2008. Multixenobiotic resistance, acetylcholine esterase activity and total oxyradical scavenging capacity of the Arctic spider crab, *Hyas araneus*, following exposure to bisphenol A, tetra bromo diphenyl ether and diallyl phthalate. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1410–1415. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.05.005
- Minier, C., Galgani, F., 1995. Multi-xenobiotic resistance in *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.*, responses of marine organisms to pollutants 39, 267–270. doi:10.1016/0141-1136(94)00056-U
- 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. doi:10.1016/S0141-1136(02)00195-2
- Minier, C., Moore, M., 1996. Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142, 165–173. doi:10.3354/meps142165
- Mitta, G., Hubert, F., Noël, T., Roch, P., 1999a. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem. FEBS* 265, 71–78.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Roch, P., 1999b. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 23), 4233–4242.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzert, M., Roch, P., 2000a. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.* 275, 12954–12962.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Roch, P., 2000b. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* 486, 185–190.
- Mix, M.C., 1976. A general model for leucocyte cell renewal in bivalve mollusks. *Mar. Fish. Rev.* 37–41.
- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., Bates, S.E., 1999. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 59, 8–13.
- Miyoshi, N., Shimizu, C., Miyoshi, S.-I., Shinoda, S., 1987. Purification and Characterization of *Vibrio vulnificus* Protease. *Microbiol. Immunol.* 31, 13–25. doi:10.1111/j.1348-0421.1987.tb03064.x
- Miyoshi, S., Shinoda, S., 1992. Activation mechanism of human Hageman factor-plasma kallikrein-kinin system by *Vibrio vulnificus* metalloprotease. *FEBS Lett.* 308, 315–319. doi:10.1016/0014-5793(92)81301-2

- Montagnani, C., Avarre, J.C., de Lorgeril, J., Quiquand, M., Boulo, V., Escoubas, J.M., 2007. First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of Pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 1–11. [doi:10.1016/j.dci.2006.04.002](https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.04.002)
- Montes, J.F., Del Río, J.A., Durfort, M., García-Valero, J., 1997. The protozoan parasite *Perkinsus atlanticus* elicits a unique defensive response in the clam *Tapes semidecussatus*. *Parasitology* 114, 339–349. [doi:10.1017/S003118209600861X](https://doi.org/10.1017/S003118209600861X)
- Montes, J.F., Durfort, M., García-Valero, J., 1995. Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. *Cell Tissue Res.* 279, 529–538. [doi:10.1007/BF00318165](https://doi.org/10.1007/BF00318165)
- Moore, C.A., Gelder, S.R., 1985. Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca: Bivalvia). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 104, 242–249. [doi:10.2307/3226436](https://doi.org/10.2307/3226436)
- Moore, M.N., Lowe, D.M., 1977. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. *J. Invertebr. Pathol.* 29, 18–30.
- Moreira, R., Balseiro, P., Planas, J.V., Fuste, B., Beltran, S., Novoa, B., Figueras, A., 2012. Transcriptomics of in vitro immune-stimulated hemocytes from the manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing. *PLOS ONE* 7, e35009. [doi:10.1371/journal.pone.0035009](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035009)
- Mottaleb, M.A., Meziani, M.J., Matin, M.A., Arafat, M.M., Wahab, M.A., 2015. Emerging micro-pollutants pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) contamination concerns in aquatic organisms - LC/MS and GC/MS Analysis, in: emerging micro-pollutants in the environment: occurrence, fate, and distribution, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 43–74.
- Mount, A.S., Wheeler, A.P., Paradkar, R.P., Snider, D., 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science* 304, 297–300. [doi:10.1126/science.1090506](https://doi.org/10.1126/science.1090506)
- Mourez, M., Jéhanno, M., Hofnung, M., Dassa, E., 2000. Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs à ATP binding cassette (ABC). *médecine/sciences* 16, 386. [doi:10.4267/10608/1658](https://doi.org/10.4267/10608/1658)
- Mourgaud, Y., Martinez, E., Geffard, A., Andral, B., Stanisiere, J.-Y., Amiard, J.-C., 2002. Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 7, 479–490. [doi:10.1080/1354750021000034528](https://doi.org/10.1080/1354750021000034528)

-N-

- Nakanishi, Y., Shiratsuchi, A., 2006. Mechanisms and roles of phagocytosis in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*. *Inv Surv J* 89–96.
- Nandi, B., Nandy, R.K., Sarkar, A., Ghose, A.C., 2005. Structural features, properties and regulation of the outer-membrane protein W (OmpW) of *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Read. Engl.* 151, 2975–2986. [doi:10.1099/mic.0.27995-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.27995-0)

- Nasci, C., Nesto, N., Monteduro, R.A., Da Ros, L., 2002. Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy). *Mar. Environ. Res.* 54, 811–816.
- Nebert, D.W., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Solis, W.A., Yang, Y., Dalton, T.P., 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 59, 65–85.
- Nelson, R.D., Fiegel, V.D., Simmons, R.L., 1976. Chemotaxis of human polymorphonuclear neutrophils under agarose: morphologic changes associated with the chemotactic response. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 117, 1676–1683.
- Newman, M.C., Feng, S.Y., 1982. Susceptibility and resistance of the rock crab, *Cancer irroratus*, to natural and experimental bacterial infection. *J. Invertebr. Pathol.* 40, 75–88. [doi:10.1016/0022-2011\(82\)90039-8](https://doi.org/10.1016/0022-2011(82)90039-8)
- Ni, D., Song, L., Wu, L., Chang, Y., Yu, Y., Qiu, L., Wang, L., 2007. Molecular cloning and mRNA expression of peptidoglycan recognition protein (PGRP) gene in bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819). *Dev. Comp. Immunol.* 31, 548–558. [doi:10.1016/j.dci.2006.09.001](https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.09.001)
- Nicolas, J.L., Basuyaux, O., Mazurié, J., Thébault, A., 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Organ.* 50, 35–43. [doi:10.3354/dao050035](https://doi.org/10.3354/dao050035)
- Nicolas, J.L., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R., Ansquer, D., 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Org. - Dis. AQUAT ORG* 27, 67–76. [doi:10.3354/dao027067](https://doi.org/10.3354/dao027067)
- Niemann, H.H., Schubert, W.D., Heinz, D.W., 2004. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 6, 101–112.
- Nikaido, K., Ames, G.F., 1999. One intact ATP-binding subunit is sufficient to support ATP hydrolysis and translocation in an ABC transporter, the histidine permease. *J. Biol. Chem.* 274, 26727–26735.
- Nilsson, L., Oliver, J.D., Kjelleberg, S., 1991. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* 173, 5054–5059.
- Novas, A., Cao, A., Barcia, R., Ramos-Martinez, J.I., 2004. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 390–394.

-O-

- Oden, E., Burioli, E.A.V., Trancart, S., Pitel, P.H., Houssin, M., 2016. Multilocus sequence analysis of *Vibrio splendidus* related-strains isolated from blue mussel *Mytilus* sp. during mortality events. *Aquaculture* 464, 420–427. [doi:10.1016/j.aquaculture.2016.07.024](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.024)
- Olafsen, J.A., 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture, Advanced Biotechnology in Hatchery Production* 200, 223–247. [doi:10.1016/S0044-8486\(01\)00702-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00702-5)
- Oliver, J.D., Wear, J.E., Thomas, M.B., Warner, M., Linder, K., 1986. Production of extracellular enzymes and cytotoxicity by *Vibrio vulnificus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 5, 99–111.

- Oliver, J.L., Lewis, T.D., Faisal, M., Kaattari, S.L., 1999. Analysis of the effects of *Perkinsus marinus* proteases on plasma proteins of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). J. Invertebr. Pathol. 74, 173–183. doi:10.1006/jipa.1999.4879
- Olivier, V., Haines, G.K., Tan, Y., Satchell, K.J.F., 2007. Hemolysin and the multifunctional autoprocessing RTX toxin are virulence factors during intestinal infection of mice with *Vibrio cholerae* El Tor O1 strains. Infect. Immun. 75, 5035–5042. doi:10.1128/IAI.00506-07
- Olsson, Jöborn, Westerdahl, Blomberg, Kjelleberg, Conway, 1998. Survival, persistence and proliferation of *Vibrio anguillarum* in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine and faeces. J. Fish Dis. 21, 1–9. doi:10.1046/j.1365-2761.1998.00327.x
- Ordás, M.C., Novoa, B., Figueras, A., 2000. Modulation of the chemiluminescence response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes. Fish Shellfish Immunol. 10, 611–622. doi:10.1006/fsim.2000.0276
- O'Toole, R., Von Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P.-E., Wolf-Watz, H., 2004. Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. Microb. Pathog. 37, 41–46. doi:10.1016/j.micpath.2004.03.001
- Oubella, R., Paillard, C., Maes, P., Auffret, M., 1994. Changes in hemolymph parameters in the manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge. J. Invertebr. Pathol. 64, 33–38. doi:10.1006/jipa.1994.1065

-P-

- Paillard, C., Gausson, S., Nicolas, J.L., le Pennec, J.P., Haras, D., 2006. Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. Aquaculture 253, 25–38. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.03.047
- Paillard, C., Le Roux, F., Borrego, J.J., 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. Aquat. Living Resour. 17, 477–498. doi:10.1051/alr:2004054
- Pain, S., Devin, S., Parant, M., 2007. Biomarker versus environmental factors: seasonal variations and modelling multixenobiotic defence (MXD) transport activity in transplanted zebra mussels. Sci. Total Environ. 373, 103–112. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.10.054
- Pain, S., Parant, M., 2003. Response of multixenobiotic defence mechanism in *Dreissena polymorpha* exposed to environmental stress. Chemosphere 52, 1105–1113. doi:10.1016/S0045-6535(03)00356-4
- Parisi, M.-G., Li, H., Jouvet, L.B.P., Dyrinda, E.A., Parrinello, N., Cammarata, M., Roch, P., 2008. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. Fish Shellfish Immunol. 25, 834–840. doi:10.1016/j.fsi.2008.09.005
- Park, K.-S., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M.-H., Okada, K., Iida, T., Honda, T., 2004. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect. Immun. 72, 6659–6665. doi:10.1128/IAI.72.11.6659-6665.2004

- Pass, D.A., Dybdahl, R., Mannion, M.M., 1987. Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. *Aquaculture* 65, 149–169.
- Perales-Vela, H.V., Peña-Castro, J.M., Cañizares-Villanueva, R.O., 2006. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 64, 1–10. [doi:10.1016/j.chemosphere.2005.11.024](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.024)
- Petushok, N., Gabryelak, T., Pałecz, D., Zavodnik, L., Szollosi Varga, I., Deér, K.A., 2002. Comparative study of the xenobiotic metabolising system in the digestive gland of the bivalve molluscs in different aquatic ecosystems and in aquaria experiments. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 61, 65–72.
- Pipe, R.K., 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 111–122.
- Pipe, R.K., 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* 22, 595–603. [doi:10.1007/BF01072941](https://doi.org/10.1007/BF01072941)
- Pirkova, A.V., Demenko, D.P., 2008. Cases of shell disease in the giant oyster *Crassostrea gigas* (*Bivalvia*) cultivated in the Black Sea. *Russ. J. Mar. Biol.* 34, 309. [doi:10.1134/S1063074008050076](https://doi.org/10.1134/S1063074008050076)
- Poirier, A.C., 2016. Etude comparative des interactions *Vibrio* - phagocytes dans l'environnement marin. Université de Montpellier
- Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Smital, T., 2010. A novel ABC transporter: The first insight into zebrafish (*Danio rerio*) ABCH1. *Mar. Environ. Res., PRIMO 15 Fifteenth International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO15)* 69, Supplement 1, S11–S13. [doi:10.1016/j.marenvres.2009.10.016](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.10.016)
- Porte, C., Biosca, X., Solé, M., Albaigés, J., 2001. The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 112, 261–268.
- Porter, L., Butler IV, M., Reeves, R.H., 2001. Normal bacterial flora of the spiny lobster *Panulirus argus* and its possible role in shell disease. *Mar. Freshw. Res.* 52, 1401–1405.
- Prado, S., Romalde, J.L., Montes, J., Barja, J.L., 2005. Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Dis. Aquat. Organ.* 67, 209–215. [doi:10.3354/dao067209](https://doi.org/10.3354/dao067209)

-Q-

- Qiu, L., Song, L., Xu, W., Ni, D., Yu, Y., 2007. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 451–466. [doi:10.1016/j.fsi.2006.05.003](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.05.003)

-R-

- Raghunath, P., 2015. Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Front. Microbiol.* 5. [doi:10.3389/fmicb.2014.00805](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00805)

- Raimondi, F., Kao, J.P., Fiorentini, C., Fabbri, A., Donelli, G., Gasparini, N., Rubino, A., Fasano, A., 2000. Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in *in vitro* systems. *Infect. Immun.* 68, 3180–3185.
- Ramade, F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie : Fondements et applications. Lavoisier.
- Randa, M.A., Polz, M.F., Lim, E., 2004. Effects of Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5469–5476. doi:10.1128/AEM.70.9.5469-5476.2004
- Ratkaj, I., Žurga, P., Bulog, A., Peter-Katalinić, J., Pavelić, S.K., 2015. 70-kDa heat shock cognate protein expression as a putative biomarker of heavy-metal burden in *Mytilus galloprovincialis*. *SpringerPlus* 4. doi:10.1186/s40064-015-1007-6
- Rebello, M. de F., Figueiredo, E. de S., Mariante, R.M., Nóbrega, A., Barros, C.M. de, Allodi, S., 2013. New Insights from the Oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. *PLOS ONE* 8, e57384. doi:10.1371/journal.pone.0057384
- Reidl, J., Klose, K.E., 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 125–139. doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00605.x
- Reimschuessel, R., Stoskopf, M.K., Bennett, R.O., 1990. Myocarditis in the common cuttlefish (*Sepia officinalis*). *J. Comp. Pathol.* 102, 291–297.
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Chollet, B., Cochenne, N., Gerard, A., 2000. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Organ.* 42, 173–183.
- Renault, T., Lipart, C., Arzul, I., 2001. A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *J. Fish Dis.* 24, 369–376. doi:10.1046/j.1365-2761.2001.00300.x
- Renwraantz, L., Lam, A., 2010. Soluble and surface-bound aminopeptidase in eosinophilic blood cells from *Mytilus edulis*. *J. Invertebr. Pathol.* 103, 68–70. doi:10.1016/j.jip.2009.10.001
- Renwraantz, L., Schmalmack, W., Redel, R., Friebel, B., Schneeweiss, H., 1996. Conversion of phenoloxidase and peroxidase indicators in individual haemocytes of *Mytilus edulis* specimens and isolation of phenoloxidase from haemocyte extract. *J. Comp. Physiol. B* 165, 647–658. doi:10.1007/BF00301133
- Renwraantz, L.R., Yoshino, T.P., Cheng, T.C., 1979. Size determination of hemocytes from the American oyster, *Crassostrea virginica*, and the description of a phagocytosis mechanism. *Zool Jb Physiol* 1–12.
- Ricciardi, K.L., Poynton, H.C., Duphily, B.J., Blalock, B.J., Robinson, W.E., 2016. Bioconcentration and depuration of (14)C-labeled 17 α -ethinyl estradiol and 4-nonylphenol in individual organs of the marine bivalve *Mytilus edulis* L. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 863–873. doi:10.1002/etc.3137
- Richardson, K., 1991. Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: analysis of motility mutants in three animal models. *Infect. Immun.* 59, 2727–2736.
- Richardson, M., 2002. Environmental Xenobiotics. CRC Press.
- Riout, D., 2013. Motilité cellulaire et immunocompétente des hémocytes de mollusques marins : applications aux diagnostics environnementaux. Université du Havre.

- Rioul, D., Lebel, J.-M., Le Foll, F., 2013. Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes *in vitro*. Cytotechnology 65, 749–758. doi:10.1007/s10616-013-9558-2
- Rioul, D., Pasquier, J., Boulangé-Lecomte, C., Poret, A., Abbas, I., Marin, M., Minier, C., Le Foll, F., 2014. The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 153, 98–109. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.012
- Rivera, A., Santiago, K., Torres, J., Sastre, M.P., Rivera, F.F., 1999. Bacteria associated with hemolymph in the crab *Callinectes bocourti* in Puerto Rico. Bull. Mar. Sci. 64, 543–548.
- Robey, R.W., Steadman, K., Polgar, O., Morisaki, K., Blayney, M., Mistry, P., Bates, S.E., 2004. Pheophorbide A is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. Cancer Res. 64, 1242–1246.
- Rodkhum, C., Hirono, I., Crosa, J.H., Aoki, T., 2005. Four novel hemolysin genes of *Vibrio anguillarum* and their virulence to rainbow trout. Microb. Pathog. 39, 109–119. doi:10.1016/j.micpath.2005.06.004
- Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Aquat. Toxicol. 22, 81–113. doi:10.1016/0166-445X(92)90026-J
- Romalde, J.L., Barja, J.L., 2010. Bacteria in molluscs: Good and bad guys. Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol Mendez-Vilas Ed Formatex Res Cent:136–147
- Romalde, J.L., Dieguez, A.L., Lasa, A., Balboa, S., 2014. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. Front. Microbiol. 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00413
- Romero, A., Dios, S., Poisa-Beiro, L., Costa, M.M., Posada, D., Figueras, A., Novoa, B., 2011. Individual sequence variability and functional activities of fibrinogen-related proteins (FREPs) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates. Dev. Comp. Immunol. 35, 334–344. doi:10.1016/j.dci.2010.10.007
- Romestand, B., Corbier, F., Roch, P., 2002. Protease inhibitors and haemagglutinins associated with resistance to the protozoan parasite, *Perkinsus marinus*, in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Parasitology 125, 323–329.
- Ropert, M., Olivési, R., 2002. Etat de l'activité mytilicole sur le secteur de Quend-Palge (Picardie) - Première approche des problèmes de mortalités printanières de moules associées au développement saisonnier de vase sur les bouchots.
- Rosenberg, E., Ben-Haim, Y., 2002. Microbial diseases of corals and global warming. Environ. Microbiol. 4, 318–326.
- Rosenberg, E., Falkovitz, L., 2004. The *Vibrio shiloi*/*Oculina patagonica* model system of coral bleaching. Annu. Rev. Microbiol. 58, 143–159. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123610
- Rosenberg, E., Loya, Y., 2013. Coral Health and Disease. Springer Science & Business Media.
- Rubio-Portillo, E., Yarza, P., Peñalver, C., Ramos-Esplá, A.A., Antón, J., 2014. New insights into *Oculina patagonica* coral diseases and their associated *Vibrio* spp. communities. ISME J. 8, 1794–1807. doi:10.1038/ismej.2014.33

Russell, D.G., 2001. Phagocytosis, in: eLS. John Wiley & Sons, Ltd.

-S-

Sanchez, J., Holmgren, J., 2011. Cholera toxin - a foe & a friend. *Indian J. Med. Res.* 133, 153–163.

Sánchez-Marín, P., Aierbe, E., Lorenzo, J.I., Mubiana, V.K., Beiras, R., Blust, R., 2016. Dynamic modeling of copper bioaccumulation by *Mytilus edulis* in the presence of humic acid aggregates. *Aquat. Toxicol.* 178, 165–170. doi:10.1016/j.aquatox.2016.07.021

Sangster, C.R., Smolowitz, R.M., 2003. Description of *Vibrio alginolyticus* infection in cultured *Sepia officinalis*, *Sepia apama*, and *Sepia pharaonis*. *Biol. Bull.* 205, 233–234.

Santos, M. de S., Orth, K., 2014. Intracellular *Vibrio parahaemolyticus* escapes the vacuole and establishes a replicative niche in the cytosol of epithelial cells. *mBio* 5, e01506-14. doi:10.1128/mBio.01506-14

Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G., Váradi, A., 2006. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol. Rev.* 86, 1179–1236. doi:10.1152/physrev.00037.2005

Satchell, K.J.F., 2003. Activation and suppression of the proinflammatory immune response by *Vibrio cholerae* toxins. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 5, 1241–1247.

Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M., Garcia, C., 2010. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microb. Ecol.* 59, 787–798. doi:10.1007/s00248-009-9620-y

Sawabe, Tomoo, Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Amin, A.R., Mino, S., Nakagawa, S., Sawabe, Toko, Kumar, R., Fukui, Y., Satomi, M., Matsushima, R., Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., Christen, R., Maruyama, F., Kurokawa, K., Hayashi, T., 2013. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Front. Microbiol.* 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00414

Schinkel, A.H., Jonker, J.W., 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 3–29.

Schmitt, L., Tampé, R., 2002. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 754–760.

Schneeweiss, H., Renwrandt, L., 1993. Analysis of the attraction of haemocytes from *Mytilus edulis* by molecules of bacterial origin. *Dev. Comp. Immunol.* 17, 377–387.

Senior, A.E., al-Shawi, M.K., Urbatsch, I.L., 1995. The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett.* 377, 285–289. doi:10.1016/0014-5793(95)01345-8

Serafim, A., Lopes, B., Company, R., Ferreira, A.M., Bebianno, M.J., 2008. Comparative petroleum hydrocarbons levels and biochemical responses in mussels from hydrothermal vents (*Bathymodiolus azoricus*) and coastal environments (*Mytilus galloprovincialis*). *Mar. Pollut. Bull.*, 5th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology 57, 529–537. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.02.015

Sharom, F.J., 2008. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 9, 105–127. doi:10.2217/14622416.9.1.105

- Sheweita, S.A., 2000. Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Curr. Drug Metab.* 1, 107–132.
- Shi, Z., Jain, S., Kim, I.-W., Peng, X.-X., Abraham, I., Youssef, D.T.A., Fu, L.-W., El Sayed, K., Ambudkar, S.V., Chen, Z.-S., 2007. Siphonol A, a marine-derived siphonane triterpene, potently reverses P-glycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistance in cancer cells. *Cancer Sci.* 98, 1373–1380. [doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00554.x](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00554.x)
- Shime-Hattori, A., Iida, T., Arita, M., Park, K.-S., Kodama, T., Honda, T., 2006. Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 264, 89–97. [doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00438.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00438.x)
- Shinoda, S., Miyoshi, S.-I., 2011. Proteases produced by vibrios. *Biocontrol Sci.* 16, 1–11.
- Shyamala, V., Baichwal, V., Beall, E., Ames, G.F., 1991. Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J. Biol. Chem.* 266, 18714–18719.
- Simpson, L.M., Oliver, J.D., 1983. Siderophore production by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 41, 644–649.
- Smital, T., Kurelec, B., 1998. The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. *Mutat. Res.* 399, 43–53.
- Smith, G.S., Lumsden, J.H., 1983. Special Issue Advances in Veterinary Immunology 1982 Review of neutrophil adherence, chemotaxis, phagocytosis and killing. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 4, 177–236. [doi:10.1016/0165-2427\(83\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0165-2427(83)90058-2)
- Smith, K.E.C., Schmidt, S.N., Dom, N., Blust, R., Holmstrup, M., Mayer, P., 2013. Baseline Toxic Mixtures of Non-Toxic Chemicals: “Solubility Addition” Increases Exposure for Solid Hydrophobic Chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2026–2033. [doi:10.1021/es3040472](https://doi.org/10.1021/es3040472)
- Smith, V.J., 2001. Immunology of Invertebrates: Cellular, in: eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Snieszko, S.F., 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol.* 6, 197–208. [doi:10.1111/j.1095-8649.1974.tb04537.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1974.tb04537.x)
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 23–28.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., Johansson, M.W., 1994. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 712, 155–161.
- Soniat, T.M., 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of Eastern oysters in the Gulf of Mexico. *Journal of Shellfish Research* 15(1):35-43
- Sonthe, M., Cantet, F., Toubiana, M., Trapani, M.-R., Parisi, M.-G., Cammarata, M., Roch, P., 2012. Gene expression specificity of the mussel antifungal mytimycin (MytM). *Fish Shellfish Immunol.* 32, 45–50. [doi:10.1016/j.fsi.2011.10.017](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.10.017)
- Sørum, H., Hval, A.B., Heum, M., Daae, F.L., Wiik, R., 1990. Plasmid profiling of *Vibrio salmonicida* for epidemiological studies of cold-water vibriosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1033–1037.
- Soudant, P., E. Chu, F.-L., Volety, A., 2013. Host–parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. *J. Invertebr. Pathol.* 114, 196–216. [doi:10.1016/j.jip.2013.06.001](https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.06.001)
- Stefano, G.B., 1990. Neurobiology of *Mytilus Edulis*. Manchester University Press.

- Stroeher, U.H., Karageorgos, L.E., Morona, R., Manning, P.A., 1992. Serotype conversion in *Vibrio cholerae* O1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 2566–2570.
- Sutherland, K.P., Porter, J.W., Torres, C., 2004. Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellate corals. Mar. Ecol. Prog. Ser. 266, 273–302. doi:10.3354/meps266273
- Suthienkul, O., Ishibashi, M., Iida, T., Netti, N., Supavej, S., Eampokalap, B., Makino, M., Honda, T., 1995. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. J. Infect. Dis. 172, 1405–1408.
- Svensson, S., Särngren, A., Förlin, L., 2003. Mussel blood cells, resistant to the cytotoxic effects of okadaic acid, do not express cell membrane p-glycoprotein activity (multixenobiotic resistance). Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 65, 27–37.
- Syed, K.A., Klose, K.E., 2011. *Vibrio cholerae* flagellar synthesis and virulence, in: ramamurthy, t., bhattacharya, s.k. (eds.), epidemiological and molecular aspects on cholera, infectious disease. Springer New York, pp. 203–212. doi:10.1007/978-1-60327-265-0_11
- Szakács, G., Váradi, A., Ozveg-Laczka, C., Sarkadi, B., 2008. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). Drug Discov. Today 13, 379–393. doi:10.1016/j.drudis.2007.12.010

-T-

- Tafalla, C., Gómez-León, J., Novoa, B., Figueras, A., 2003. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. Dev. Comp. Immunol. 27, 197–205.
- Takahashi, K., Kimura, Y., Nagata, K., Yamamoto, A., Matsuo, M., Ueda, K., 2005. ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis. Med. Mol. Morphol. 38, 2–12. doi:10.1007/s00795-004-0278-8
- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S., 2003. Toll-like receptors. Annu. Rev. Immunol. 21, 335–376. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126
- Taleb, Z.M., Benghali, S., Kaddour, A., Boutiba, Z., 2007. Monitoring the biological effects of pollution on the Algerian west coast using mussels *Mytilus galloprovincialis*. OCEANOLOGIA, 49 (4), 1–22.
- Tall, B.D., La Peyre, J.F., Bier, J.W., Miliotis, M.D., Hanes, D.E., Kothary, M.H., Shah, D.B., Faisal, M., 1999. *Perkinsus marinus* extracellular protease modulates survival of *Vibrio vulnificus* in Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4261–4263.
- Tanguy, M., McKenna, P., Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Danger, J.-M., Siah, A., 2013a. Sequence analysis of a normalized cDNA library of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* LGP32 strain. Results Immunol. 3, 40–50. doi:10.1016/j.rinim.2013.04.001
- Tanguy, M., McKenna, P., Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Danger, J.-M., Siah, A., 2013b. Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*. Dev. Comp. Immunol. 39, 419–429. doi:10.1016/j.dci.2012.10.015
- Tantillo, G. m., Fontanarosa, M., Di Pinto, A., Musti, M., 2004. Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. Lett. Appl. Microbiol. 39, 117–126. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01568.x

- Teo, J.W.P., Zhang, L.-H., Poh, C.L., 2003. Cloning and characterization of a novel lipase from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene* 312, 181–188.
- Thelin, K.H., Taylor, R.K., 1996. Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. *Infect. Immun.* 64, 2853–2856.
- Thompson, F.L., Iida, T., Swings, J., 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 403–431. doi:10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004
- Thompson, F.L., Li, Y., Gomez-Gil, B., Thompson, C.C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Rupp, G.S., Pereira, A., De Bem, M.M., Sorgeloos, P., Swings, J., 2003. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 245–252. doi:10.1099/ijs.0.02447-0
- Tison, D.L., Nishibuchi, M., Greenwood, J.D., Seidler, R.J., 1982. *Vibrio vulnificus* biogroup 2: new biogroup pathogenic for eels. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 640–646.
- Toomey, B.H., Epel, D., 1993. Multixenobiotic resistance in *Urechis caupo* embryos: protection from environmental toxins. *Biol. Bull.* 185, 355–364.
- Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246, 37–61. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.01.002
- Toro, J., Innes, D.J., Thompson, R.J., 2004. Genetic variation among life-history stages of mussels in a *Mytilus edulis*–*M. trossulus* hybrid zone. *Mar. Biol.* 145, 713–725. doi:10.1007/s00227-004-1363-1
- Torreilles, J., Guérin, M.C., Roch, P., 1997. Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 21, 267–275.
- Toti, L., Serratore, P., Croci, L., Stacchini, A., Milandri, S., Cozzi, L., 1996. Bacteria isolated from seawater and mussels: Identification and toxin production, in: M.A.N. microbiologie, aliments, nutrition. Presented at the Journées d’Etudes du Collège International Alexandre Tessier, Société informations études et édition en nutrition et alimentation, pp. 161–165.
- Toubiana, M., Rosani, U., Giambelluca, S., Cammarata, M., Gerdol, M., Pallavicini, A., Venier, P., Roch, P., 2014. Toll signal transduction pathway in bivalves: Complete cds of intermediate elements and related gene transcription levels in hemocytes of immune stimulated *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Comp. Immunol.* 45, 300–312. doi:10.1016/j.dci.2014.03.021
- Toyofuku, H., 2014. *Vibrio parahaemolyticus* Risk Management in Japan, in: Sauvé, G. (Ed.), *Molluscan Shellfish Safety*. Springer Netherlands, pp. 129–136. doi:10.1007/978-94-007-6588-7_11
- Travers, M.-A., Boettcher Miller, K., Roque, A., Friedman, C.S., 2015. Bacterial diseases in marine bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* doi:10.1016/j.jip.2015.07.010
- Travers, M.-A., Mersni Achour, R., Haffner, P., Tourbiez, D., Cassone, A.-L., Morga, B., Doghri, I., Garcia, C., Renault, T., Fruitier-Arnaudin, I., Saulnier, D., 2014. First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events. *J. Invertebr. Pathol.* 123, 38–48. doi:10.1016/j.jip.2014.04.009

- Travers, M.-A., Pepin, J.-F., Soletchnik, P., Guesdon, S., Le Moine, O., 2016. Mortalités de moules bleues dans les Pertuis Charentais: description et facteurs liés - MORBLEU.
- Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S., Jacques, M., 2014. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Vet. Res.* 78, 110–116.
- Trigiani-Fernandez, E.R., 2001. The capsular polysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 Bengal: Induction and modulation of host-cell mediated immune responses. [URL http://archive.hshsl.umaryland.edu/handle/10713/1140](http://archive.hshsl.umaryland.edu/handle/10713/1140)
- Tubiash, H.S., Chanley, P.E., Leifson, E., 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks i. etiology and epizootiology. *J. Bacteriol.* 90, 1036–1044.
- Tutundjian, R., Minier, C., 2007. Effect of temperature on the expression of P-glycoprotein in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *J. Therm. Biol.*, role of thermal environment in stress adaptation and tolerance: ingegration of multiple stressors 32, 171–177. [doi:10.1016/j.jtherbio.2007.01.008](https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.008)

-U-

- Ueda, K., Taguchi, Y., Morishima, M., 1997. How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Semin. Cancer Biol.* 8, 151–159. [doi:10.1006/scbi.1997.0066](https://doi.org/10.1006/scbi.1997.0066)
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 825–852. [doi:10.1146/annurev.immunol.20.103001.114744](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.103001.114744)

-V-

- Van der Henst, C., Scrignari, T., Maclachlan, C., Blokesch, M., 2016. An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *ISME J.* 10, 897–910. [doi:10.1038/ismej.2015.165](https://doi.org/10.1038/ismej.2015.165)
- Van der Knaap, W.P., Loker, E.S., 1990. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitol. Today Pers.* Ed 6, 175–182.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Vanhove, A.S., Duperthuy, M., Charrière, G.M., Le Roux, F., Goudenège, D., Gourbal, B., Kieffer-Jaquinod, S., Couté, Y., Wai, S.N., Destoumieux-Garzón, D., 2015. Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environ. Microbiol.* 17, 1152–1165. [doi:10.1111/1462-2920.12535](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12535)
- Vanhove, A.S., Rubio, T.P., Nguyen, A.N., Lemire, A., Roche, D., Nicod, J., Vergnes, A., Poirier, A.C., Disconzi, E., Bachère, E., Le Roux, F., Jacq, A., Charrière, G.M., Destoumieux-Garzón, D., 2016. Copper homeostasis at the host *Vibrio* interface: lessons from intracellular *Vibrio* transcriptomics. *Environ. Microbiol.* 18, 875–888. [doi:10.1111/1462-2920.13083](https://doi.org/10.1111/1462-2920.13083)
- Vasta, G.R., 2012. Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. *Adv. Exp. Med. Biol.* 946, 21–36. [doi:10.1007/978-1-4614-0106-3_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3_2)

- Velazquez-Roman, J., León-Sicairos, N., Flores-Villaseñor, H., Villafañá-Rauda, S., Canizalez-Roman, A., 2012. Association of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 present in the coastal environment of Northwest Mexico with cases of recurrent diarrhea between 2004 and 2010. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1794–1803. [doi:10.1128/AEM.06953-11](https://doi.org/10.1128/AEM.06953-11)
- Venier, P., De Pittà, C., Bernante, F., Varotto, L., De Nardi, B., Bovo, G., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A., Pallavicini, A., Lanfranchi, G., 2009. MytiBase: a knowledgebase of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences. *BMC Genomics* 10, 72. [doi:10.1186/1471-2164-10-72](https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-72)
- Venier, P., Varotto, L., Rosani, U., Millino, C., Celegato, B., Bernante, F., Lanfranchi, G., Novoa, B., Roch, P., Figueras, A., Pallavicini, A., 2011. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics* 12, 69. [doi:10.1186/1471-2164-12-69](https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-69)
- Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 104, 355–372. [doi:10.1016/0742-8413\(93\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90001-2)
- Villamil, L., Gómez-León, J., Gómez-Chiarri, M., 2007. Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 968–977. [doi:10.1016/j.dci.2007.01.006](https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.01.006)
- Voss, E., Attridge, S.R., 1993. In vitro production of toxin-coregulated pili by *Vibrio cholerae* El Tor. *Microb. Pathog.* 15, 255–268. [doi:10.1006/mpat.1993.1076](https://doi.org/10.1006/mpat.1993.1076)
- Voss, E., Manning, P.A., Attridge, S.R., 1996. The toxin-coregulated pilus is a colonization factor and protective antigen of *Vibrio cholerae* El Tor. *Microb. Pathog.* 20, 141–153. [doi:10.1006/mpat.1996.0013](https://doi.org/10.1006/mpat.1996.0013)
- Vrolijk, N.H., Targett, N.M., Woodin, B.R., Stegeman, J.J., 1994. Toxicological and ecological implications of biotransformation enzymes in the tropical teleost *Chaetodon capistratus*. *Mar. Biol.* 119, 151–158. [doi:10.1007/BF00350117](https://doi.org/10.1007/BF00350117)
- Vuddhakul, V., Chowdhury, A., Laohaprertthisan, V., Pungrasamee, P., Patararungrong, N., Thianmontri, P., Ishibashi, M., Matsumoto, C., Nishibuchi, M., 2000. Isolation of a Pandemic O3:K6 Clone of a *Vibrio parahaemolyticus* Strain from environmental and clinical sources in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2685–2689. [doi:10.1128/AEM.66.6.2685-2689.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2685-2689.2000)

-W-

- Walker, C.H., Sibly, R.M., Hopkin, S.P., Peakall, D.B., 2016. Principles of Ecotoxicology, Fourth Edition. CRC Press.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J., 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945–951.
- Wall, D., Kaiser, D., 1999. Type IV pili and cell motility. *Mol. Microbiol.* 32, 01-10. [doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01339.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01339.x)
- Wang, W., 2011. Bacterial diseases of crabs: a review. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 18–26. [doi:10.1016/j.jip.2010.09.018](https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.018)

- Wang, Z., Lu, X., Liang, Y., Wang, C., 2010. *Haplosporidium nelsoni* and *H. costale* in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from China's coasts. Dis. Aquat. Organ. 89, 223–228. doi:10.3354/dao02196
- Watnick, P.I., Kolter, R., 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. Mol. Microbiol. 34, 586–595.
- Wei, X., Yang, Jianmin, Yang, D., Xu, J., Liu, X., Yang, Jialong, Fang, J., Qiao, H., 2012. Molecular cloning and mRNA expression of two peptidoglycan recognition protein (PGRP) genes from mollusk *Solen grandis*. Fish Shellfish Immunol. 32, 178–185. doi:10.1016/j.fsi.2011.11.009
- Wells, H., Gray, E., 1960. The Seasonal Occurrence of *Mytilus edulis* on the Carolina Coast as a Result of Transport around Cape Hatteras. URL <https://www.jstor.org>
- Welsh, P.C., Sizemore, R.K., 1985. Incidence of bacteremia in stressed and unstressed populations of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Appl. Environ. Microbiol. 50, 420–425.
- West, P.A., 1989. The human pathogenic vibrios a public health update with environmental perspectives. Epidemiol. Infect. 103, 1–34.
- Williams, D.E., Dawe, S.C., Kent, M.L., Andersen, R.J., Craig, M., Holmes, C.F., 1997. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and *in vivo* evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology 35, 1617–1625.
- Wong, S.K., Zhang, X.-H., Woo, N.Y.S., 2012. *Vibrio alginolyticus* thermolabile hemolysin (TLH) induces apoptosis, membrane vesiculation and necrosis in sea bream erythrocytes. Aquaculture 330–333, 29–36. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.12.012
- Woo, P.T.K., Leatherland, J.F., Bruno, D.W., 2011. Fish Diseases and Disorders. CABI.
- Wootton, E.C., Dyrinda, E.A., Ratcliffe, N.A., 2003. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). Fish Shellfish Immunol. 15, 195–210.
- Wu, X., Pan, J., 2000. An intracellular prokaryotic microorganism associated with lesions in the oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould. J. Fish Dis. 23, 409–414. doi:10.1046/j.1365-2761.2000.00243.x

-X-

- Xu, C., Li, C.Y.-T., Kong, A.-N.T., 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. Arch. Pharm. Res. 28, 249–268.
- Xue, Q., Itoh, N., Schey, K.L., Cooper, R.K., La Peyre, J.F., 2009. Evidence indicating the existence of a novel family of serine protease inhibitors that may be involved in marine invertebrate immunity. Fish Shellfish Immunol. 27, 250–259. doi:10.1016/j.fsi.2009.05.006
- Xue, Q., Renault, T., 2000. Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. J. Invertebr. Pathol. 76, 155–163. doi:10.1006/jipa.2000.4965

-Y-

- Yeaman, M.R., Yount, N.Y., 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55, 27–55. doi:10.1124/pr.55.1.2
- Yildiz, F.H., Visick, K.L., 2009. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol.* 17, 109–118. doi:10.1016/j.tim.2008.12.004
- Yoshida, S., Ogawa, M., Mizuguchi, Y., 1985. Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 47, 446–451.

-Z-

- Zaidenstein, R., Sadik, C., Lerner, L., Valinsky, L., Kopelowitz, J., Yishai, R., Agmon, V., Parsons, M., Bopp, C., Weinberger, M., 2008. Clinical characteristics and molecular subtyping of *Vibrio vulnificus* illnesses, Israel. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1875–1882. doi:10.3201/eid1412.080499
- Zaja, R., Klobucar, G.I.V., Sauerborn Klobucar, R., Hackenberger, B.K., Smital, T., 2006. Haemolymph as compartment for efficient and non-destructive determination of P-glycoprotein (Pgp) mediated MXR activity in bivalves. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 143, 103–112. doi:10.1016/j.cbpc.2005.12.009
- Zhang, Guofan, Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, Jiafeng, Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, Shoudu, Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Yingxiang, Li, Na, Wang, Jinpeng, Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, Hailong, Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, Shu, Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, Junyi, Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, Ning, Qian, L., Zhang, Guojie, Li, Yingrui, Yang, Huanming, Liu, X., Wang, Jian, Yin, Y., Wang, Jun, 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. doi:10.1038/nature11413
- Zhang, L., Li, L., Zhang, G., 2011. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 653–660. doi:10.1016/j.fsi.2010.12.023
- Zhong, L., Chen, J., Zhang, X.–., Jiang, Y.–., 2009. Entry of *Vibrio cincinnatiensis* into viable but nonculturable state and its resuscitation. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 247–252. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02522.x
- Zhu, Z., Xu, T., He, Z., Wu, X., Wu, L., Meng, Q., Huang, J., 2012. *Rickettsia*-like organism infection associated with mass mortalities of blood clam, *Tegillarca granosa*, in the Yueqing Bay in China. *Acta Oceanol. Sin.* 31, 106–115. doi:10.1007/s13131-012-0182-3

ANNEXES

**Annexe 1 : Motilité des hémocytes adhérentes en tant que
potentiel marqueur d'immunocompétence et des effets
immunotoxiques des bivalves**

Motility of adherent hemocytes as a potential marker of immunocompetence and immunotoxic effects in bivalves

D. Rioult,¹ Y. Ben Cheikh,² R. Pédén,²
F. Bultelle,² S. Betoulle,¹ J.-M. Lebel,³
F. Le Foll²

¹UMR-I 02 INERIS URCA-ULH SEBIO/Unité Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques, Université de Reims Champagne Ardenne; ²UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO/Unité Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques, Université du Havre; ³UMR BOREA «Biologie des ORGANismes et Ecosystèmes Aquatiques», MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7208, IRD-207, Université de Caen Basse-Normandie, Caen, France

Introduction

Hemocytes are the formed elements of hemolymph, found as circulating immunocompetent cells in the open vascular system of bivalve molluscs. In a first phase of response to microbial threat, hemocytes migrate toward infected sites¹ to deliver, subsequently, effective immune responses associating reactive oxygen and NO production, antimicrobial peptides secretion and phagocytosis. In marine mussels, while exclusively based onto innate mechanisms, recruitment and activation of hemocytes have been suggested to be pathogen-specific.²

Mussels are well adapted to fluctuant coastal and estuarine environment, being tolerant to large-scale variations of temperature, salinity and oxygen levels.³ Therefore, mussel beds extend from intertidal rocky shores and paralic locations to subtidal oceanic waters. Since 2011 however, abnormal episodes of mortality are described in various mussel-rearing sites of the Atlantic coast, reminiscent of those repeatedly affecting oysters since the beginning of 1960s.⁴ These increased incidence and prevalence of mussel lethal diseases are of multiple etiology, resulting from the combined action of various stressors, including elevated temperature and turbidity, microbial and chemical contamination, physiologic stress associated to reproduction. The pathogenic bacterium *Vibrio splendidus* is supposed to be involved in mussel mortalities.⁵ To find answers to this issue, Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) has proposed the Mytilos program.⁶

In the present study, we communicate preliminary results focused on the effects of tem-

perature and water contamination by xenobiotics onto the first phase of hemocyte immune response, e.g. cell migration. To quantify individual cell velocities *in vitro*, we have used an approach based on nuclei tracking under time-lapse microscopy imaging.⁷ The hemocytes were collected from individuals at two distinct sampling sites differentially impacted by pollution, highly contaminated embankments in the largest seaport of west Europe (Le Havre) and a less contaminated area corresponding to the rocky shore of Yport.⁸ The main objective of the work was to determine if mussel hemocyte migration velocity is affected by temperature or sampling site.

Materials and Methods

Adult mussels (4-5 cm shell length), *Mytilus* sp., were collected between December and February in 2012 on the intertidal rocky shore of Yport, France (49°44'N, 0°18'E) or from the sea harbor of Le Havre, in a subtidal bed of basin Vétillard (49°74'N, 0°31'E). Mussels were transported to the laboratory for immediate analysis. Hemolymph was aseptically withdrawn, in a BSL2 laminar flow cabinet, from the posterior adductor muscle sinus, by gentle aspiration with a 1 mL syringe equipped with a 22G needle.

Volumes of crude hemolymph corresponding to 100 µL or 200 µL were deposited in 35-mm culture dishes (Corning, New York, NY, USA). After 30 min of sedimentation, hemolymph was removed and each well or dish were washed twice by using marine physiological saline solution (MPSS) containing (in mM): 470 NaCl, 10 KCl, 10 CaCl₂, 10 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (Hepes), 48.7 MgSO₄, pH 7.8, 0.2 µm sterile filtered. Osmolality of MPSS was checked to be close to local seawater osmolality (963 mOsmol.kg⁻¹) by using a vapor pressure osmometer (WescorElitech, Logan, UT, USA).

To quantify velocity, cells in culture were incubated with 10 µM of the nuclei-specific fluorescent probe Hoechst 33342 for 30 minutes at 14°C. A culture dish was placed on the stage of a TE-2000 inverted microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) equipped for epifluorescence excitation (HBO arc lamp with 377/50 nm bandpass filter) and time-lapse imaging. A Peltier temperature controller (PDMI-2 and TC-202A; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) keeps preparation at 14°C for extended live cell imaging. Wild-field epifluorescence time-lapse imaging was performed with a x10 objective (numerical aperture 0.3). A VCM-D1 shutter (Uniblitz, Vincent Associates, NY, USA) was added in the illumination pathway to cut off the excitation light between two image recordings. Camera and shutter were controlled by Metamorph (Molecular Device, Sunnyvale, CA,

Correspondence: Frank Le Foll, UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO/Unité Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques, Université du Havre, France.
E-mail: frank.lefoll@univ-lehavre.fr

Key words: bivalves, immunocompetence and immunotoxic effects.

Conference presentation: *ECOBIM meeting*, 2014 May, Brest, France.

Acknowledgments: this work is a part the IPOC project (*Interactions between Pollution and Climate changes: development of improved monitoring strategy*) supported by the French Agence Nationale de la Recherche and received fundings from the State/Region Plan Contract (CPER) allocated through the Research Federation FED 4116 SCALE (*Sciences Appliquées à L'Environnement*). Damien Rioult and Yosra Ben Cheikh were recipients for doctoral fellowships from the *Conseil Régional de Haute-Normandie*. Romain Pédén was a recipient for a doctoral fellowship from the *Communauté De L'Agglomération Havraise* (CODAH).

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 3.0 License (CC BY-NC 3.0).

©Copyright D. Rioult et al., 2014
Licensee PAGEPress, Italy
Journal of Xenobiotics 2014; 4:4899
doi:10.4081/xeno.2014.4899

USA) as acquisition software. A CCD Coolsnap EZ camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA) captured 12-bit digital of 1392×1040 pixels greyscale images every 30 s for 30 min (409 nm long path emission filter). Camera and software were calibrated to express distance in microns. Time-series image stacks were imported into Metamorph Analysis software. The track Objects application (available with Multi-Dimensional Motion Analysis option) was started. Typically, for each biological replicate, 20 nuclei were randomly chosen to be tracked.

Results and Discussion

Velocity of hemocyte migration was followed by dynamic microscopy *in vitro*. After plating, cells were allowed to adhere 20 min and then imaged in MPSS, by using time-lapse recordings under controlled temperature. As described earlier,⁹ the cell population was extremely motile. Individual hemocytes exhibited fast outstanding morphology changes. This feature renders difficult image-to-image single cell tracking because cells escaped to automatic shape recognition. This difficulty was overcome by using nuclei tracking with the DNA fluorescent probe Hoechst 33342⁷ since nuclei shapes

remained remarkably constant and were easy to follow over time. After 30 min of wide field epifluorescence recording at a rate of 1 image/30 s, off-line tracking was carried out on a set of 20 nuclei, selected randomly in the microscopic field (Figure 1A). Figure 1B shows the resulting determined trajectories. Mussel hemocytes migrated by random taxis (Figure 1C). Cells escaping the recorded field or belonging to aggregates were excluded from the analysis.

In order to determine the influence of temperature elevation on hemocyte migration speed, the bath temperature was changed in steps of 30 min from 14 to 22°C. This resulted in a speed up of mussel hemocyte velocity. This response was evidenced at the single cell level and was also found when migration speed was expressed as a mean populational velocity, computed from the average migration of twenty

individual cells randomly sample in multiplicate experiments (Figure 2A).

In a previous work, we have studied the level of multi xenobiotic resistance (MXR)-efflux activity in hemocytes collected from the same contrasted sites, in terms of xenobiotic contamination, than in the present work. It was concluded that, in *Mytilus sp.*, the MXR phenotype is mediated by an ABCC/MRP-type transporter, induced by chemical contamination in eosinophilic granular hemocytes.⁸ Herein, we found that motility of hemocytes from Le Havre harbor is significantly diminished par comparison to migration speed of cells obtained from mussels sampled from the reference site, Yport (Figure 2B).

These results have some physiological implications. Water temperature and levels of chemical contamination are determinants of

immune cell migration speed in *Mytilus edulis*. In particular, we provide the first evidence for a decrease of immune cell migration activity in organisms collected from polluted areas. This observation may be understood as a decrease of immunocompetence in conditions of high water chemical contamination. Further experiments are necessary to confirm these data and to investigate the regulations of mussel hemocytes motility in the presence of both microbial and chemical contaminants.

References

1. Bachere E, Gueguen Y, Gonzalez M, de Langeril J, Garnier J, Romestand B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev* 2004;198:149-68.
2. Costa M, Prado-Alvarez M, Gestal C, Li H, Roch P, Novoa B, Figueras A. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish Shellfish Immunol* 2009;26:515-23.
3. Gosling E. Bivalve molluscs. London: Blackwell Publishing; 2003.
4. Soletchnik P, Lambert C, Costil K. Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *J Shellfish Res* 2005;24:197-207.
5. Lacoste A, Jalabert F, Malham S, Cuffe A, Gelebart F, Cordevant C, et al. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Organ* 2001;46:139-45.
6. Robert S, Bedier E. Réseau national d'observation de la moule bleue *Mytilus edulis* - MYTILOBS. Campagne 2012. IFREMER 2013;1-32.
7. Rioult D, Lebel, J-M, Le Foll F. Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes in vitro. *Cytotechnology* 2013;65:749-58.
8. Rioult D, Pasquier J, Boulangé-Lecomte C, Poret A, Abbas I, Marin M, et al. The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. *Aquat Toxicol* 2014;153:98-109.
9. Le Foll F, Rioult D, Boussa S, Pasquier J, Dagher Z, Leboulenger F. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish Shellfish Immunol* 2010;28:372-86.

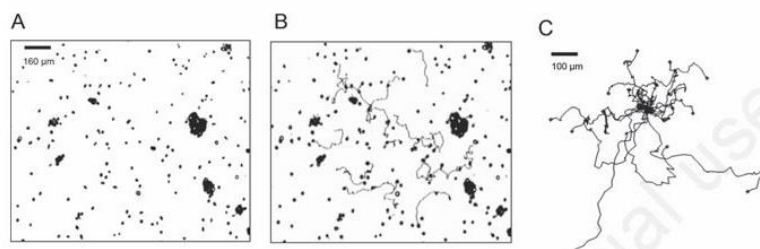


Figure 1. *Mytilus edulis* hemocyte tracking by time lapse imaging of Hoechst 33342-stained nuclei. A) 500 µL of freshly withdrawn hemolymph were plated on glass bottom 35-mm dishes and covered with 2 mL marine physiological saline solution. Nuclei were stained with Hoechst 33342. Last wide field epifluorescence inverted micrograph from a 30-min 0.033-Hz time-lapse sequence under x10 magnification used to track nuclei (HBO arc lamp, excitation 377/50 nm, emission 409 nm). B) Twenty hemocyte tracks computed from nuclei in motion for 30 min in the microscopic field and distinct from aggregates are superimposed to the image shown in A. C) Overlay of twenty hemocyte trajectories displayed from a common origin. The point reached by each cell after 30 min recording is indicated by a small cross.

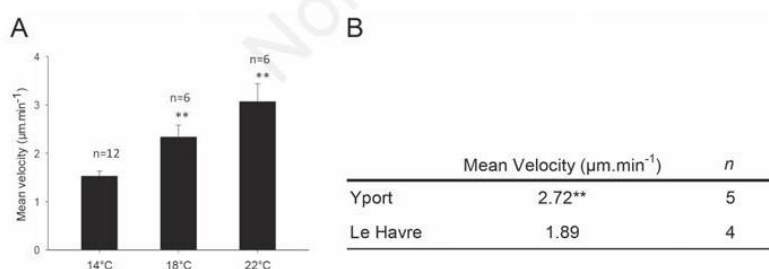


Figure 2. Effects of bath temperature or mussel sampling site on hemocyte velocity. A) Dependence of mean hemocyte velocity to temperature. Freshly collected hemocytes were deposited in a temperature-controlled recording chamber filled with marine physiological saline solution. Replicated cell cultures obtained from individuals n=6-12 collected from a mussel bed of basin Vetillard (seaport of Le Havre). Mean cell velocities were determined from 20 trajectories recorded during 30 min. B) Dependence of mean hemocyte velocity to mussel origins. Hemocytes were collected from mussels originating from the rocky shore of Yport or from the seaport of Le Havre, placed at 14°C and used to 30-min endpoint mean migration velocity recordings. Migration speeds are expressed as mean±SEM. Values significantly different from velocity of hemocytes from Le Havre at 14°C are indicated (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, Student's *t*-tests).

Hemocyte defense mechanisms in *Mytilus edulis*: interactions with *Vibrio Splendidus* sp. and MXR phenotype modulation by environmental contaminants

ABSTRACT

Mytilus edulis is a bivalve mollusc representing an economic and ecotoxicological interest. This sentinel species is known for its resistance to chemical and biological contaminants. However, for few years, abnormal mortality events have been reported for farmed blue mussels in France where different *Vibrio* strains were isolated.

The first section of this thesis describes cellular and physiological interactions of *V. Splendidus* isolates with the blue mussel. Experimental infections allowed the selection of two isolates affiliated to *V. splendidus/V. hemicentroti* type strains: a virulent 10/068 1T1 and an innocuous 12/056 M24T1. These two strains were GFP-tagged and validated for their growth characteristics and virulence as genuine models for exposure. *V. splendidus* 10/068 1T1 is capable to alter different functions of hemocytes including motility, adhesion, internalization, ROS production, phagosome maturation and viability, unlike the avirulent strain. Furthermore, bacterial extracellular products appeared toxic and inhibit cellular responses (internalization and ROS production). Finally, we successfully reproduced experimental infection by water tank cohabitation assays with septic animals. Infection monitoring shows the targeting of gills by bacteria.

The second section explores the MXR (MultiXenobiotic Resistance) system functioning in the blue mussel. For the first time, a complete ABCG2 amino acid sequence was established. Molecular characterization shows the presence of the *abcg2* transcript in hemocytes and gills and its homology with other proteins from various species. The combination of the fluorescent probes bodipy prazosin and pheophorbide A with specific blockers demonstrate the transporter efflux activity and its heterogeneity in tissues and cells. Moreover, the expression of three ABC transporters (*abcb*, *abcc*, *abcg2*) identified in the blue mussel has been shown to be modulated by chemical contaminants. Mussels exposed to BaP in the laboratory or collected from contaminated mussel beds in the field show upregulated *abc* transcripts in gills whereas these mRNA undergone a downregulation in hemocytes. Season had also an effect on mRNA levels and interacted with site effects. Only the *abcb* gene displayed a more abundant mRNA level in gills dissected from animals collected in the more polluted area all over the diachronic study.

In conclusion, our results demonstrate the vulnerability of the blue mussel towards a pathogen. The immunotoxic impact of environmental xenobiotics and the precise role of ABC efflux pumps in the immune system of the mussel has yet to be explored.

Key words: *Vibrio*, ECPs, hemocyte, immunity, MXR, ABC transporters, contaminants, gills

Mécanismes de défense hémodocytes chez *Mytilus edulis* : Interactions avec *Vibrio Splendidus* sp. et modulation du phénotype MXR par les contaminants environnementaux

RESUME

Mytilus edulis est un mollusque bivalve de grand intérêt économique et écotoxicologique. Cette espèce sentinelle est connue pour sa résistance aux contaminants chimiques et biologiques. Néanmoins, depuis quelques années la moule bleue est touchée par des mortalités dans les élevages des Pertuis Charentais ayant pour dénominateur commun la présence de bactéries virulentes de type *Vibrio*.

Le premier axe de cette thèse décrit les interactions des isolats de *V. Splendidus* avec la moule bleue au niveau cellulaire et physiologique. Les infections expérimentales ont permis la sélection de deux isolats bactériens affiliés à *V. splendidus/V. hemicentroti* : une souche virulente codée 10/068 1T1 et une souche inoffensive codée 12/056 M24T1. Ces deux bactéries ont été marquées à la GFP et validées en tant que modèles authentiques d'exposition à travers leurs caractéristiques de croissance et de virulence. Par ailleurs, *V. hemicentroti* 10/068 1T1 est capable d'altérer différentes fonctions hémodocytes incluant la motilité, l'adhésion, l'internalisation, la production de ROS, la maturation du phagosome et la viabilité contrairement à la bactérie non virulente. Les produits extracellulaires bactériens semblent être toxiques et inhibent certaines réponses cellulaires (internalisation et production de ROS). Enfin, nous avons reproduit avec succès l'infection des animaux par le pathogène via un modèle expérimental de cohabitation. Le suivi de l'infection montre que *V. splendidus* 10/068 1T1 a pour cible principale les branchies.

Le deuxième axe explore le fonctionnement du système MXR (MultiXenobiotic Resistance) chez la moule bleue. La séquence codante complète d'un nouveau transporteur ABCG2 a été établie et la protéine résultante a été identifiée. La caractérisation moléculaire montre la présence du transcrite dans les hémodocytes ainsi que dans les branchies et son homologie avec les autres protéines appartenant à diverses espèces. L'utilisation des sondes fluorescentes bodipy prazosin et pheophorbide A, combinées avec des bloqueurs spécifiques, démontre l'activité d'efflux de ce transporteur et son hétérogénéité dans les tissus et cellules. Par ailleurs, il est également démontré que l'expression des trois transporteurs ABC (abcb, abcc, abcg2) identifiés chez la moule bleue est modulée par les contaminants chimiques. Les animaux exposés au BaP au laboratoire ou prélevés sur un terrain contaminé montrent une surexpression des transcrits abc dans les branchies et une sous expression dans les hémodocytes. La saisonnalité, sur le terrain, a également un effet sur les niveaux des transcrits et interfère avec les réponses liées aux contaminants. Seul le transporteur abcb exprimé dans les branchies n'est pas affecté par des variations saisonnières et montre une surexpression dans le site contaminé tout au long de l'année.

En conclusion, nos résultats démontrent la vulnérabilité de la moule bleue face un pathogène. L'impact immunotoxique des xénobiotiques et le rôle que peuvent jouer les transporteurs ABC dans le fonctionnement du système immunitaire des moules reste à explorer.

Mots clés : *Vibrio*, ECPs, hémodocyte, immunité, MXR, transporteurs ABC, contaminants, branchies