

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**MODULATION IMMUNOLOGIQUE CHEZ LES BIVALVES PAR
L'ENVIRONNEMENT ET LA CONTAMINATION DANS L'OPTIQUE DES
CHANGEMENTS CLIMATIQUES.**

Par
Alexandre Beaudry

Mémoire présentée pour l'obtention du grade de
Maître es sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Examineur externe	Pr. Béatrice Gagnaire IRSN-LECO
Examineur interne	Pr. Yves St-Pierre INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Pr. Michel Fournier INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Stéphane Masson Ph.D. Aquarium du Québec

Dépôt final : 08-05-2016

REMERCIEMENTS

Ce mémoire a été réalisé à l'Institut Armand-Frappier de l'Institut National de la Recherche Scientifique dans le laboratoire de la Chaire de recherche du Canada en immunotoxicologie de l'environnement du Professeur Michel Fournier avec la collaboration de l'équipe de l'Aquarium du Québec et du directeur de recherches, Stéphane Masson.

Je remercie mon directeur, Michel Fournier, pour m'avoir permis de faire partie de son équipe et pour son soutien et précieux conseils pendant toute la durée de mes travaux.

Je voudrais aussi remercier mon codirecteur, Stéphane Masson, pour son aide tant théorique que technique. Je le remercie pour l'attention accordé à mon travail de rédaction et pour son aide dans la conception, l'entretien et la réparation du système de mésocosmes. J'aimerais aussi souligner son assistance dans la réception et la conservation des organismes.

Merci également à Pauline Brousseau pour son aide lors de la correction des articles scientifiques et sa collaboration lors de la planification et de l'exécution des expériences dans le Saguenay.

Je tiens également à remercier Marlene Fortier qui m'a aidé lors des expériences en laboratoire ainsi que pour la correction des articles. Ses connaissances, son assistance et son soutien ont été indispensables à la réussite de ce projet.

Je remercie mes collègues, Émilie Lacaze, Kristine Kleinert, Lauris Évariste et Marc Fraser, pour leur aide, leurs conseils et leur appui constant.

J'aimerais aussi remercier François Gagné de m'avoir accueilli dans son laboratoire du centre St-Laurent (Environnement Canada) et Chantale André pour son aide technique permettant ainsi de compléter certaines analyses.

Finalement, je tiens à remercier ma famille, ma belle-famille et amis pour leurs encouragements et leur soutien tout au long de ces années. Une mention toute spéciale à Gabrielle pour son support indispensable.

RÉSUMÉ

Les bivalves sont des organismes filtreurs largement utilisés en écotoxicologie afin de mieux comprendre les impacts de l'activité humaine sur l'environnement et les risques que cela représente. En plus de la pollution anthropique, ces organismes sont confrontés à d'importantes variations de leur habitat, qui sont susceptibles d'être amplifiées avec les changements climatiques. Ainsi, il est important d'étudier l'influence de la durée d'immersion, de la salinité et d'une hausse de température sur les compétences immunitaires des bivalves. Pour ce faire, des expériences se sont déroulées à la fois sur le terrain et en laboratoire. Les résultats obtenus démontrent que ces différents facteurs environnementaux peuvent influencer l'aptitude des bivalves à se défendre contre divers pathogènes, principalement par phagocytose, mais également lorsqu'ils sont soumis à la pollution.

TABLE DES MATIÈRES

1	CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	2
1.1	CHANGEMENTS CLIMATIQUES.....	2
1.2	ÉCOTOXICOLOGIE CHEZ LES BIVALVES	3
1.3	L'IMMUNITÉ CHEZ LES BIVALVES.....	5
1.3.1	<i>Immunité cellulaire</i>	5
1.3.2	<i>Immunité humorale</i>	6
1.4	L'INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT.....	7
1.4.1	<i>Les effets de l'environnement sur la croissance et la reproduction</i>	7
1.4.2	<i>Immunomodulation environnementale</i>	8
1.5	L'INFLUENCE DE L'ACTIVITÉ HUMAINE.....	8
1.5.1	<i>Influence de la pollution sur la croissance et la reproduction</i>	9
1.5.2	<i>Immunotoxicité</i>	10
1.6	HYPOTHÈSE DE RECHERCHE.....	12
2	METHODES SUCCINTES.....	14
2.1	CONCEPTION ET RÉALISATION DES MONTAGES EXPÉRIMENTAUX	14
2.2	METHODES D'ANALYSES.....	16
2.2.1	<i>Indices</i>	16
2.2.2	<i>Immunité cellulaire</i>	17
2.2.3	<i>Enzyme de dégradation et pro-inflammatoire</i>	17
3	DISCUSSION DE RESULTATS.....	19
3.1	INFLUENCE DE LA DURÉE D'IMMERSION (CHAPITRE 2)	19
3.2	INFLUENCE DE LA SALINITÉ ET DE LA CONTAMINATION DANS LE SAGUENAY (CHAPITRE 3).....	20
3.3	INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE (CHAPITRE 4).....	22
4	CONCLUSION.....	25
5	CHAPITRE 2 : INFLUENCE DE LA DURÉE D'IMMERSION	29
5.1	INFLUENCE OF TIDAL STRESS ON THE IMMUNOCOMPETENCE OF HEMOCYTES IN SOFT-SHELL CLAM (<i>MYA ARENARIA</i>).....	29
5.1.1	<i>Résumé</i>	30
5.1.2	<i>Introduction</i>	31
5.1.3	<i>Methods</i>	31

5.1.4	<i>Results</i>	32
5.1.5	<i>Discussion and conclusion</i>	33
5.2	INCREASE SENSITIVITY TO METALS OF HEMOCYTES OBTAINED FROM MYA ARENARIA COLLECTED AT DIFFERENT DISTANCES FROM THE SHORE.....	35
5.2.1	<i>Résumé</i>	36
5.2.2	<i>Introduction</i>	37
5.2.3	<i>Methods</i>	37
5.2.4	<i>Results</i>	39
5.2.5	<i>Discussion and conclusion</i>	40
6	CHAPITRE 3 : INFLUENCE DE LA SALINITE ET DE LA CONTAMINATION DANS LE SAGUENAY (CHAPITRE 3)	41
6.1	ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF THE IMMUNOCOMPETENCE OF TWO BIVALVES SPECIES (<i>MYA ARENARIA</i> AND <i>MYTILUS EDULIS</i>) IN THE SAGUENAY FJORD INCLUDING A SALINITY GRADIENT	41
6.1.1	<i>Résumé</i>	42
6.1.2	<i>Introduction</i>	43
6.1.3	<i>Methods</i>	44
6.1.4	<i>Results</i>	45
6.1.5	<i>Discussion and conclusion</i>	46
7	CHAPITRE 4 : INFLUENCE DE LA TEMPERATURE	49
7.1	INFLUENCE OF TEMPERATURE ON IMMUNOCOMPETENCE OF BLUE MUSSELS (<i>MYTILUS EDULIS</i>).....	49
7.1.1	<i>Résumé</i>	50
7.1.2	<i>Introduction</i>	51
7.1.3	<i>Methods</i>	52
7.1.4	<i>Results</i>	55
7.1.5	<i>Discussion and Conclusion</i>	59
8	REFERENCES	63

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 5.1 SUMMARY OF THE RESULTS OBTAINED FOR PHAGOCYtic ACTIVITY AND EFFICACY WHEN RESULTS OBTAINED IN CLAMS COLLECTED UPPER SHORE WERE COMPARED TO THE CLAMS COLLECTED AT MIDDLE SHORE. THROUGHOUT THE EXPERIMENT, WITH THE EXCEPTION OF LEAD AT THE MOTEL SITE, RESULTS OBTAINED IN CLAMS COLLECTED IN THE UPPER SHORE WERE SIGNIFICANTLY LOWER THAN RESULTS OBTAINED IN CLAMS COLLECTED IN THE MIDDLE SHORE.....40

LISTE DES FIGURES

FIGURE 5.1 PHAGOCYTOSIS ACTIVITY (1 BEAD AND MORE) AND PHAGOCYTOSIS EFFICACY (3 BEADS AND MORE) OF *MYA ARENARIA* AT UPPER SHORE (US), MIDDLE SHORE (MS) AND LOWER SHORE (LS) FROM THE SITE JARDINS IN MITIS BAY ON JULY 31ST 2012. (N = 15).....33

FIGURE 5.2 PHAGOCYTOSIS ACTIVITY (1 BEAD AND MORE) AND EFFICACY (THREE BEADS AND MORE) OF HEMOCYTES OBTAINED FROM *MYA ARENARIA* COLLECTED FROM MIDDLE (MS) AND UPPER SHORE (US) AT THE MOTEL SITE IN METIS BAY. HEMOCYTES WERE EXPOSED TO MERCURIC CHLORIDE AT CONCENTRATIONS RANGING FROM 0 UP TO 10⁻³ M. A SIGNIFICANT SUPPRESSION OF PHAGOCYTIC ACTIVITY AS WELL AS EFFICACY WAS OBSERVED FOR HEMOCYTES COLLECTED IN THE UPPER SHORE. (* P ≤ 0.05).....39

FIGURE 6.1 MAP OF THE STUDY AREA SHOWING THE 4 SITES WHERE BIVALVES WERE SAMPLED. BT: BAIE DE TADOUSSAC, BSC: BAIE SAINTE-CATHERINE, BMB: BAIE DU MOULIN-À-BAUDE, ASE: ANSE SAINT-ÉTIENNE.....44

FIGURE 6.2 PHAGOCYTIC ACTIVITY (1 BEAD AND MORE) AND EFFICACY (3 BEADS AND MORE) OF *MYA ARENARIA* (N = 15) AND *MYTILUS EDULIS* (N = 15) FROM TWO REFERENCE STATIONS IN THE SAGUENAY RIVER IN A SALINITY GRADIENT (ASE; 18 PSU AND BMB; 28 PSU). (* SIGNIFICANT DIFFERENCE BETWEEN STATION, P<0.05) 45

FIGURE 6.3 PHAGOCYTIC ACTIVITY (1 BEAD AND MORE) AND EFFICACY (3 BEADS AND MORE) OF *MYA ARENARIA* (N = 15) FROM THREE STATIONS AND *MYTILUS EDULIS* (N = 15) FROM FOUR STATIONS IN THE SAGUENAY RIVER (ASE IS EXCLUDED FOR CLAMS BECAUSE OF THE MODULATION INDUCED BY THE SALINITY GRADIENT, SEE FIGURE 1) (P<0.05).....46

FIGURE 7.1 VARIATION OF RELATIVE WEIGHT OF DIGESTIVE GLAND (DGI) AND GONADS ON TOTAL SOFT TISSUE (A) AND CONDITION INDEX (CI) (B) DURING THE EXPERIMENT (N = 30/SACRIFICE, P<0.05)55

FIGURE 7.2 HEMOCYTES VIABILITY (A), PHAGOCYTIC CAPACITY (1 BEAD AND MORE) AND EFFICACY (3 BEADS AND MORE) (B) OF *M. EDULIS* EXPOSE TO DIFFERENT TEMPERATURE (N = 30/SACRIFICE, P<0.05).....56

FIGURE 7.3 HEMOCYTES VIABILITY (A) PHAGOCYTIC CAPACITY (1 BEAD AND MORE) (B) AND EFFICACY (3 BEADS AND MORE) (C) OF *M. EDULIS* EXPOSED TO DIFFERENT TEMPERATURES. HEMOCYTES WERE CHALLENGED *IN VITRO* WITH CADMIUM CHLORIDE AT CONCENTRATION RANGING FROM 0 TO 10⁻³ M (N = 6-8/SACRIFICE, P<0.05) 57

FIGURE 7.4 LYSOZYME ACTIVITY IN CELL-FREE HEMOLYMPH (A) AND COX ACTIVITY ON HEMOCYTES (B) OF *MYTILUS EDULIS* EXPOSED TO DIFFERENT TEMPERATURES (N = 30/SACRIFICE, P<0.05)58

FIGURE 7.5 MATURATION STAGE (%) OF *MYTILUS EDULIS* FOR FEMALE AND MALE DURING THE EXPERIMENT FOLLOWING AN INCREASE OF TEMPERATURES. (N = 30/SACRIFICE)59

**Modulation immunologique chez les bivalves par l'environnement et
la contamination dans l'optique des changements climatiques :
Synthèse**

1 CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Changements climatiques

En raison des changements climatiques actuels et à venir, plusieurs modifications sont à prévoir et seront susceptibles d'affecter l'ensemble du biote. Selon les plus récents scénarios proposés, la température globale en 2100 devrait augmenter entre 1,1 et 2,9°C ou 2,4 et 6,4°C (IPCC, 2007 ; Greco *et al.*, 2011). Dans les écosystèmes marins, les principales répercussions à prévoir concernent la modification : (1) de la distribution géographique, (2) des périodes alimentaires et reproductrices, (3) de la croissance, (4) ainsi que du taux de mortalité des espèces pouvant mener à leur disparition (Greco *et al.*, 2011). Ces changements pourraient augmenter les risques de contracter diverses infections ou parasites. Les changements climatiques entraîneront des modifications de la salinité, principalement dans les estuaires et les zones côtières (Matozzo et Marin, 2011 ; Matozzo *et al.*, 2012). Le réchauffement global aura aussi des répercussions sur le cycle hydrique pouvant changer la salinité de certains milieux par une hausse ou une baisse importante des précipitations et/ou de l'évaporation (Matozzo et Marin, 2011 ; Matozzo *et al.*, 2012). Outre l'augmentation de la température et des variations de salinité, l'océan s'acidifiera progressivement en séquestrant de plus en plus de carbone, et ce comparativement aux valeurs préindustrielles. Il a été démontré que le pH a diminué de 0,1 unité jusqu'à présent, mais pourrait diminuer d'environ 0,4 unité d'ici 2100 et d'environ 0,7 unité pour 2250 ce qui pourrait affecter les organismes riche en calcium comme les bivalves (Bibby *et al.*, 2008 ; Matozzo et Marin, 2011 ; Matozzo *et al.*, 2012). Ce changement du pH pourrait également entraîner différentes problématiques au niveau biologique, physiologique et évolutif sur l'ensemble du biote marin. Il a été observé chez plusieurs espèces marines intertidales et pélagiques qu'une eau plus acide perturbe le développement et la croissance (Bibby *et al.*, 2008).

En raison de tous les impacts potentiels des changements climatiques, il est important de documenter leurs effets sur les différentes espèces afin de connaître leur sensibilité respective (Greco *et al.*, 2011). L'influence de ces variations sur les différents

paramètres physiologiques, tel que la réponse immunitaire, est primordiale à déterminer en raison de son étroite relation avec d'autres paramètres physiologiques (ex : réponse aux stress et aux contaminants; Luengen *et al.*, 2004). En raison de l'utilisation des bivalves comme espèce bioindicatrice, de leur importance économique (Gagnaire *et al.*, 2006) et écologique (Bibby *et al.*, 2008), il est primordial de vérifier l'impact que les changements climatiques pourront avoir sur la compétence immunitaire de ces espèces.

1.2 Écotoxicologie chez les bivalves

Différents programmes de recherches ont été développés pour comprendre les impacts anthropiques sur l'environnement. Différentes études écotoxicologiques ont vu le jour, recueillant à la fois des informations sur l'écologie, mais également sur les effets toxicologiques de différentes perturbations anthropiques sur l'environnement et les organismes (Gestal *et al.*, 2008 ; de Montaudouin *et al.*, 2010). Les perturbations environnementales peuvent alors être suivies (biomonitoring) et leurs impacts mesurés à l'aide d'espèces bioindicatrices (sentinelles) et de différents biomarqueurs (Amiard *et al.*, 2006 ; Gagné *et al.*, 2008). Un organisme sentinelle est une espèce sensible aux stress environnementaux et anthropiques permettant d'évaluer, à l'aide de biomarqueurs, la qualité de l'environnement dans lequel elle vit. Les perturbations observées chez ces espèces peuvent être physiologiques ou comportementales et peuvent même entraîner la disparition de l'espèce d'intérêt (van der Oost *et al.*, 2003). Le biomarqueur doit permettre d'évaluer et de comprendre les perturbations biologiques, biochimiques, physiologiques et histologiques (Lam et Gray, 2003 ; van der Oost *et al.*, 2003) provoquées par différents facteurs de stress qu'ils soient naturels ou anthropiques (Hylland, 2006). Les études de biomonitoring doivent utiliser plusieurs biomarqueurs afin d'avoir le meilleur aperçu des impacts potentiels et de faciliter leur compréhension (Moore *et al.*, 2006 ; Hylland *et al.*, 2008 ; Raftopoulou et Dimitriadis, 2010).

Depuis l'élaboration du programme « Mussel Watch » par Goldberg en 1975, l'utilisation des mollusques bivalves est répandue afin de suivre l'amélioration ou la dégradation de

l'environnement et d'en étudier les impacts biologiques et physiologiques (Zorita *et al.*, 2008). Puisque la majorité des bivalves se nourrissent de la matière en suspension, ceux-ci doivent filtrer de très grand volume d'eau quotidiennement et par le fait même, peuvent ingérer de grande quantité de contaminants (Pipe et Coles, 1995 ; Zorita *et al.*, 2008 ; Pellerin et Amiard, 2009). Leur mode de vie sessile et grégaire, leur abondance et leur grande distribution en font une espèce facile à récolter pour étudier les effets de divers xénobiotiques (Goldberg, 1975 ; Zorita *et al.*, 2008 ; Pellerin et Amiard, 2009). Les bivalves sont de bons bioindicateurs de la contamination, puisqu'ils ont la capacité de d'accumuler et de concentrer les différents composés chimiques (Fournier *et al.*, 2001 ; Blaise *et al.*, 2002 ; Pellerin et Amiard, 2009). La bioaccumulation de ces xénobiotiques varie en fonction de leurs propriétés chimiques donnant une bonne indication leur biodisponibilité dans l'environnement (Goldberg, 1975 ; e Silva *et al.*, 2006 ; Pellerin et Amiard, 2009).

Les bivalves sont reconnus pour être un bon modèle expérimental puisque leur réaction face à la présence d'un contaminant est relativement constante. En plus de leur accessibilité sur le terrain, il est possible d'obtenir des individus provenant d'aquaculteur. Il est ainsi possible d'avoir des organismes sains pour différentes études contrôles et de les transplanter (encager) dans des sites pollués. Ces organismes peuvent être utilisés pour évaluer l'effet de différents composés chimiques en laboratoire, que ce soit par des expositions *in vivo* ou *in vitro* (Goldberg, 1975 ; Zhou *et al.*, 2008). L'acquisition de connaissances sur le type et le taux de contamination ont permis d'analyser les risques qu'ils représentent à différents niveaux physiologique (immunitaire, reproductif et génétique) (Lemaire *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2008 ; Pellerin *et al.*, 2009 ; Ruiz *et al.*, 2011 ; Gust *et al.*, 2012) D'ailleurs, le système immunitaire des bivalves est reconnu pour être particulièrement sensible à la présence de xénobiotiques et aux différents stress environnementaux (Luengen *et al.*, 2004 ; Galloway et Goven, 2006 ; Malagoli *et al.*, 2007 ; Gagné *et al.*, 2009 ; Hannam *et al.*, 2009).

1.3 L'immunité chez les bivalves

L'intérêt pour l'immunité des bivalves a considérablement augmenté au cours des dernières années en raison d'importants problèmes de mortalité dans différentes fermes d'aquaculture (Guegen *et al.*, 2003 ; Tanguy *et al.*, 2008). Leur système immunitaire est reconnu pour être sensible aux différents stress environnementaux et anthropiques (Fournier *et al.*, 2000 ; Luengen *et al.*, 2004 ; Gagné *et al.*, 2009 ; Greco *et al.*, 2011) et est apte à identifier divers pathogènes et à éliminer ceux-ci (Pipe et Coles 1995). Ce système a évolué afin de permettre diverses réponses, soit cellulaire et humorale, selon le risque rencontré (Guegen *et al.*, 2003 ; Tanguy *et al.*, 2008). La défense cellulaire est exercée par les hémocytes principalement par phagocytose (Auffret, 2005 ; Matozzo *et al.*, 2012 ; Mosca *et al.*, 2013) alors que la défense humorale consiste à la production d'enzymes de dégradation et d'intermédiaires réactifs à l'oxygène (Lee et Yang, 2002 ; Auffret, 2005 ; Tanguy *et al.*, 2013 ; Gagné *et al.*, 2015). Trois principaux paramètres sont évalués pour la défense immunitaire des mollusques: le nombre d'hémocytes, leur aptitude à phagocyter, ainsi que la production d'enzymes et d'intermédiaires réactifs à l'oxygène (Fournier *et al.*, 2000 ; Wootton *et al.*, 2003 ; Auffret, 2005 ; Gagné *et al.*, 2015).

1.3.1 Immunité cellulaire

Le système circulatoire des bivalves étant ouvert, les hémocytes représentent la première et principale ligne de défense (Canesi *et al.*, 2002). Ces cellules immunitaires sont présentes à la fois dans l'hémolymphe et dans les différents tissus (Canesi *et al.*, 2002 ; Mydlarz *et al.*, 2006). Lors de la détection du PAMPs d'un pathogène (Pathogen-Associated Molecular Patterns) par un des divers PRRs (Pattern Recognition Receptors), la réponse immunitaire est déclenchée. Chez les bivalves, sept groupes de PRRs ont été identifiés tel que les PGRPs (Peptidoglycan Recognition Proteins), les GNBPs (Gram-Negative Binding Proteins), les CLEC (C-type Lectins), les galectins, les TEPs (Thioester-containing Proteins), les SRs (Scavenger Receptors) et les TLRs (Toll-Like Receptors), permettant au système immunitaire des bivalves d'identifier une grande variété de pathogènes (Song *et al.*, 2010). Suite à cette reconnaissance, il se

produit une augmentation du nombre de cellules circulantes en direction du site d'infection. Cette hausse est provoquée par une migration des tissus vers l'hémolymphe (Pipe et Coles, 1995 ; Mydlarz *et al.*, 2006 ; Mosca *et al.*, 2013) et mènera à la phagocytose du corps étranger par les hémocytes (Pipe et Coles, 1995 ; Lemaitre et Hoffmann, 2007 ; Takahashi et Muroga, 2008). La phagocytose est un processus immunitaire consistant à l'ingestion d'une molécule ou cellule pouvant affecter l'organisme, incluant des bactéries, des algues et des levures (Canesi *et al.*, 2002). Chez les bivalves, la phagocytose est exercée par les hémocytes et est divisée en cinq étapes précises : la reconnaissance, le chimiotactisme, l'attachement, l'incorporation et la destruction du pathogène (Pipe et Coles, 1995 ; Lemaitre et Hoffmann, 2007).

Afin d'évaluer la compétence des hémocytes à phagocyter un corps étranger, plusieurs méthodes peuvent être employées. Généralement, cette compétence immunitaire est évaluée en fonction de la vitesse de disparition (clearance) de bactéries injectées dans l'hémolymphe, ou en évaluant l'aptitude des hémocytes à phagocyter un nombre précis de bactéries ou de particules (Pipe et Coles, 1995), ou des microbilles de latex fluorescentes (Blaise *et al.*, 2002 ; Canesi *et al.*, 2002).

1.3.2 Immunité humorale

Une fois la phagocytose effectuée par les hémocytes, plusieurs autres mécanismes entrent en action pour assurer l'élimination du pathogène, tel que la libération d'enzymes de dégradation et la production d'intermédiaires réactifs à l'oxygène (ROI) (Auffret, 2005 ; Lemaitre et Hoffman, 2007). Lorsque la particule ou le pathogène est trop gros pour être phagocyté, les hémocytes encapsulent le pathogène et l'attaquent à l'aide de molécules cytotoxiques (enzymes de dégradation et radicaux libres) (Lemaitre et Hoffmann, 2007). Comme pour toutes les espèces produisant des radicaux libres, les bivalves libèrent des enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutases, catalase, glutathione peroxydase, etc.) afin de neutraliser les effets potentiellement dommageables de ceux-ci sur l'organisme suite à l'élimination du pathogène (Tanguy *et al.*, 2013 ; Gagné *et al.*, 2015). La production des enzymes de dégradation est généralement mesurée dans le plasma ou sur les hémocytes, mais les résultats obtenus sont variables selon le medium analysé (Luna-Gonzalez *et al.*, 2008).

1.4 L'influence de l'environnement

Les habitats colonisés par *Mytilus sp.* sont très variables (Casas *et al.*, 2004 ; Szefer *et al.*, 2006) en raison de sa grande tolérance aux variations environnementales et par son mode d'alimentation par filtration (Pipe et Coles, 1995 ; Zorita *et al.*, 2008). De par son mode de vie sessile (Walker *et al.*, 2001 ; Pellerin *et al.*, 2009) et exposé dans la zone intertidale, ce groupe d'espèce s'est adaptée afin de coloniser et de supporter d'importantes modifications tant au niveau biotique qu'abiotique. En plus de cette grande tolérance à une multitude de conditions climatiques, ces bivalves doivent être aptes à faire face à des changements rapides de certains facteurs tels que la salinité, la température et le pH. De plus, ces paramètres environnementaux risquent de varier de plus en plus en raison des risques associés aux changements climatiques.

1.4.1 Les effets de l'environnement sur la croissance et la reproduction

Tel que mentionné précédemment, les bivalves peuvent subir d'importantes variations environnementales en raison de leur mode de vie. Ces différents facteurs biotiques et abiotiques peuvent influencer différents processus comme la croissance et la reproduction (Lemaire *et al.*, 2006). La croissance des bivalves est affectée par la température (Hanson *et al.*, 1988 ; Morris et Corkum, 1999), la salinité (Navarro *et al.*, 1988), la qualité et l'abondance de nourriture (Clausen et Riisgard, 1996), l'hydrodynamisme (Wildish et Miyares, 1990), ainsi que la durée d'exposition à l'air (Davies et Pirie, 1980). De ce fait, la condition générale des bivalves peut être modulée par l'ensemble de ces facteurs.

Au niveau reproductif, l'environnement peut avoir un impact sur le développement des gonades, mais également sur la ponte (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002 ; Lemaire *et al.*, 2006 ; Fraser *et al.*, 2013). En plus d'influencer la croissance, il a été démontré par Pieters *et al.* (1980) que la qualité nutritive influençait la production de gamètes. De leur côté, Gauthier-Clerc *et al.* (2002) ont observé qu'un manque de nourriture entraînait un délai dans le processus de gamétogénèse. Ce cycle est également modulé par la température jusqu'au moment de la libération des gamètes (Lemaire *et al.*, 2006).

1.4.2 Immunomodulation environnementale

Les différentes recherches effectuées sur le système immunitaire des bivalves au cours des 20 dernières années ont permis de constater sa sensibilité face aux différents stress environnementaux (Mosca *et al.*, 2013 ; Gagné *et al.*, 2009 ; Bussell *et al.*, 2008). Plusieurs études ont rapporté une modulation provoquée par les variations saisonnières (de Montaudouin *et al.*, 2010), de la température (Lemaire *et al.*, 2006 ; Monari *et al.*, 2007 ; Lesser *et al.*, 2010), de la salinité (Gagnaire *et al.*, 2006 ; Bussell *et al.*, 2008) et du pH (Matozzo *et al.*, 2012). Les variations observées dans ces études étaient au niveau du nombre d'hémocytes, de leur locomotion et de leur étalement, mais également au niveau de leur compétence phagocytaire. Entre autres, les travaux de Lemaire *et al.* (2006) ont montré que la température influençait la gamétogénèse et la ponte des bivalves. Cependant, certaines de ces études ont démontré que le processus de ponte influençait la défense exercée par les hémocytes, plus précisément en ce qui concerne la phagocytose. En effet, Lemaire *et al.* (2006) ont observé une diminution de la compétence immunitaire durant ce moment crucial pour le renouvellement d'une population. Toutefois, cette réduction de la phagocytose se rétablit relativement rapidement après le début de la reproduction (Li *et al.*, 2008 ; Fraser *et al.*, 2013).

1.5 L'influence de l'activité humaine

En raison de la forte présence humaine, les zones côtières, les estuaires et les milieux aquatiques sont soumis à de fortes perturbations entraînant potentiellement une pollution de type chimique, industrielle, et urbaine (Goldberg, 1975 ; Andral *et al.*, 2004). Cette contamination entraîne une dégradation de la qualité de l'environnement et peut avoir des répercussions à différents niveaux (Andral *et al.*, 2004). Ainsi, il est crucial d'effectuer des suivis (Goldberg, 1975 ; 1986) du taux de contamination à la fois dans les organismes et dans la matrice sédimentaire afin de bien évaluer les impacts des xénobiotiques présents (Fernandez *et al.*, 2010a).

Chez les bivalves, l'accumulation des contaminants se fait principalement par diffusion passive via la respiration branchiale et par transport actif résultant de la filtration de l'eau et de l'ingestion des particules présentes (McGeer *et al.*, 2004 ; Aasen *et al.*,

2006). Les tissus directement exposés aux xénobiotiques accumulent ceux-ci en fonction de leur biodisponibilité (e Silva *et al.*, 2006). Cependant, les facteurs de bioaccumulation varient selon le type de contaminant, le niveau de pollution de l'eau et des sédiments (Pereira *et al.*, 2004) et de la source alimentaire. Le taux de bioaccumulation diffère également en fonction de la saison, des précipitations (Baumard *et al.*, 1999), du pH (Caussy *et al.*, 2003), de la température (Gossiaux *et al.*, 1998), de la salinité et de la profondeur (Andral *et al.*, 2004). Le taux d'accumulation peut également être influencé par les caractéristiques propre à l'espèce, l'individu ou à sa population en fonction du cycle de vie, du stade écophysio-logique, de la dynamique de croissance, de l'âge et de la maturité sexuelle (Andral *et al.*, 2004). La différence entre les espèces est aussi un facteur à considérer lors d'études écotoxicologiques puisque leur réponse peut différer (Fournier *et al.*, 2001 ; Fournier *et al.*, 2005 ; Salo *et al.*, 2005 ; Beaudry *et al.*, 2015).

1.5.1 Influence de la pollution sur la croissance et la reproduction

La diminution de la densité d'une population est généralement un bon indicateur d'une situation problématique pouvant être induite par la pollution (Whitehead *et al.*, 2003). Lorsqu'un effet est visible au niveau de la population, cela signifie que des impacts ont précédemment eu lieu à des niveaux biologiques inférieurs. En effet, les perturbations causées par la contamination peuvent survenir à différents niveaux que ce soit physiologique, cellulaire, métabolique ou génétique (Lam et Gray, 2003 ; van der Oost *et al.*, 2003). Cependant, les impacts provoqués par les xénobiotiques présents dans l'environnement varient en fonction de leur concentration et de leur durée d'exposition (Fournier *et al.*, 2005 ; Salo *et al.*, 2005). La toxicité induite aura alors un effet aigu ou chronique, pouvant entraîner un affaiblissement de l'organisme et éventuellement mener à la mort de celui-ci (Walker *et al.*, 2001). Plusieurs études ont démontré les impacts sur la croissance et la reproduction de plusieurs xénobiotiques tel que les contaminants organochlorés (Monirith *et al.*, 2003), les PBDE (polybromodiphényléthers) (Ramu *et al.*, 2007), les métaux lourds (Sauvé *et al.*, 2002 ; Zangrandi *et al.*, 2005), les tributylétains (Widdows et Page, 1993 ; Guolan et Yong, 1994), les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) (Peachy, 2003 ; Cai *et al.*,

2008), les perturbateurs endocriniens (Witorsch, 2002) et les PCB (polychlorobiphényles) (Canesi *et al.*, 2003).

Ces travaux ont démontré que la condition générale des bivalves peut être affectée par les xénobiotiques présents dans l'environnement. En cas d'exposition chronique, la présence de certains métaux lourds peut affecter la croissance des bivalves (Widdows et Page, 1993 ; Guolan et Yong, 1994 ; Sauvé *et al.*, 2002). Les travaux de Walker *et al.* (2001) ont montré qu'une exposition aiguë à de plus fortes concentrations peut entraîner une hausse de la mortalité. Différentes études ont également rapporté des bouleversements dans les processus reproductif et de gamétogénèse (Walker *et al.*, 2001 ; Witorsch, 2002 ; Ruiz *et al.*, 2011).

1.5.2 Immunotoxicité

Les estuaires et les zones côtières sont considérés comme les environnements les plus perturbés et contaminés en raison de la présence humaine (Sokolova et Lannig, 2008). Il est donc important d'évaluer les perturbations causées par la pollution sur les divers organismes et populations présentes, mais également sur différentes fonctions physiologiques. Le système immunitaire des bivalves qui est reconnu pour être particulièrement sensible à la présence de xénobiotiques, est un système clé à évaluer lors d'études écotoxicologiques (Fournier *et al.*, 2005 ; Salo *et al.*, 2005 ; Hannam *et al.*, 2009). Ce système peut être affecté différemment en fonction de la pollution environnementale, la concentration des contaminants et la durée d'exposition (aiguë ou chronique) (Fournier *et al.*, 2005 ; Salo *et al.*, 2005 ; Perez et Fontanetti, 2010). Différents facteurs biotiques et abiotiques peuvent amplifier ou réduire l'influence de certains contaminants (Pipe et Coles, 1995 ; Sokolova et Lannig, 2008). Pour cette raison, plusieurs études immunotoxicologiques ont été effectuées avec des bivalves dans différentes conditions afin d'évaluer l'effet de composés pouvant se retrouver dans l'environnement. Parallèlement, il a été démontré qu'une perturbation du système immunitaire par la contamination peut provoquer différents effets tels qu'une immunosuppression, une immunostimulation ou une hypersensibilité. Ces modulations immunitaires peuvent entraîner une hausse des risques d'infection (Pipe et Coles, 1995 ; Gagné *et al.*, 2015), des maladies auto-immunes ou des cancers (Brousseau *et*

al., 2012). Selon Pipe et Coles (1995) et Gagné *et al.* (2015), lorsque les perturbations deviennent trop importantes, les bivalves peuvent devenir sensibles à certains pathogènes ne représentant habituellement aucun risque tel que *Vibrio* sp. Les principaux paramètres évalués sont le nombre total d'hémocytes, leur taux de viabilité, leur aptitude à phagocyter et la libération d'enzymes, de cytokines et d'intermédiaires réactifs à l'oxygène (Auffret, 2005 ; Brousseau *et al.*, 2012 ; Gagné *et al.*, 2015).

Suite à l'exposition à certains xénobiotiques, le nombre d'hémocytes circulants peut varier. Une augmentation d'hémocytes est généralement provoquée par une prolifération ou par une migration accrue à partir des différents tissus vers l'hémolymphe (Mydlarz *et al.*, 2006 ; Mosca *et al.*, 2013). À l'opposé, une diminution peut être causée par une multitude de facteurs tels qu'une hausse de la lyse cellulaire, de l'apoptose, de la diapédèse ou par une dysfonction métabolique entraînant une réduction de la production d'ATP, du recrutement ou de la migration (déplacement) des hémocytes (Sokolova *et al.*, 2004 ; Cherkasov *et al.*, 2007 ; Sheir et Handy, 2010). Une diminution peut également être observée via une réduction du nombre d'hémocytes viables suite à une exposition aux eaux usées (municipale, agricole et industrielle) ou à divers xénobiotiques tel que démontré dans plusieurs travaux (Sauvé *et al.*, 2002 ; Cherkasov *et al.*, 2007 ; Duchemin *et al.*, 2008 ; Hannam *et al.*, 2009 ; Gagné *et al.*, 2015).

Outre ces modulations, certaines fonctions, telle que la phagocytose, peut être modifiée par différentes sources de contamination (Sauvé *et al.*, 2002 ; Cherkasov *et al.*, 2007). Différents travaux ont démontré une courbe de réponse classique lors d'exposition à différents xénobiotiques. Cette réponse débute par une absence de cytotoxicité et par une stimulation de la phagocytose. Au fur et à mesure que la concentration augmente, une absence de toxicité et de modulation de la phagocytose est observée, puis se développe une augmentation progressive de la cytotoxicité combinée à une diminution de la phagocytose. Finalement, de fortes concentrations peuvent engendrer une importante toxicité cellulaire et une inhibition de la phagocytose (Sauvé *et al.*, 2002 ; Perez et Fontanetti, 2010). Les différentes études en laboratoire et sur le terrain permettent de confirmer que la compétence phagocytaire des bivalves peut être affectée par la présence de xénobiotiques dans l'environnement, influençant leur

capacité à se défendre efficacement contre un pathogène (Pipe et Coles, 1995 ; Brousseau *et al.*, 2000 ; Sauvé *et al.*, 2002). En plus de la concentration des xénobiotiques, l'altération de la phagocytose varie selon la durée d'exposition et la nature du contaminant (Perez et Fontanetti, 2010).

La présence de contaminants dans l'environnement peut également perturber la libération des enzymes de dégradation ou lysosomales par les hémocytes (Pipe et Coles, 1995 ; Gust *et al.*, 2012 ; Gillis *et al.*, 2014). Cependant, aucun consensus n'a été émis quant à l'impact de la pollution en général. Puisque cette production enzymatique peut être mesurée dans le plasma ou directement à partir des hémocytes, l'effet obtenu suite à l'exposition à un contaminant démontre habituellement une grande variabilité (Anderson, 1993 ; Pipe et Coles, 1995). Les travaux de Ciacci *et al.* (2011) ont démontré que l'activité des lysozymes peut être réduite en présence de certains xénobiotiques tel que le chrome. Cependant, bon nombre de facteurs peuvent faire augmenter l'activité des lysozymes, soit la présence de bactéries, les stress physiologiques (Mydlarz *et al.*, 2006 ; Gust *et al.*, 2012) ou l'exposition aux effluents municipaux (Gillis *et al.*, 2014).

1.6 Hypothèse de recherche

Puisque l'activité humaine est en cause dans les changements climatiques et dans la dégradation de l'environnement, il est important de comprendre les impacts pouvant survenir dans le futur. Afin de réaliser une meilleure gestion des populations de bivalves, il est important d'évaluer l'impact engendré par différents paramètres environnementaux et par la contamination. L'objectifs spécifiques de cette étude étaient d'observer les variations immunitaires (cellulaires et humorales) provoquées par les changements climatiques. Les paramètres choisis étaient la durée d'immersion, la salinité et la température. Pour ce faire, des bivalves seront récoltés dans différents sites ou achetés chez un aquaculteur selon les besoins pour une évaluation *in vivo*. Les cellules immunitaires des organismes seront prélevées et soumises à différentes expositions *in vitro*. Ces différentes analyses nous permettrons de connaître

l'immunomodulation engendrées par ces paramètres susceptibles d'être affectés par les changements climatiques.

2 MÉTHODES SUCCINTES

2.1 Conception et réalisation des montages expérimentaux

Afin de déterminer l'influence des paramètres environnementaux ou de la pollution, diverses expériences sur le terrain et en laboratoire ont été réalisées. Suivant les problématiques retenues en laboratoire et sur le terrain, deux espèces sentinelles ont été utilisées, soit la mye commune (*Mya arenaria*) ou la moule bleue (*Mytilus edulis*).

Dans un premier temps, la baie de Mitis a été sélectionnée comme site d'étude pour évaluer les modulations immunitaires provoquées par les marées sur la mye commune (Chapitre 2). La mye commune a été préconisée en raison de sa présence et de sa facilité de récolte à différents niveaux altimétriques dans cette baie qui présente un grand niveau d'exondation à marée basse. Un inventaire a initialement été effectué afin d'identifier les sites ayant le meilleur potentiel de récolte. Les dates d'expériences (juillet et août) ont été déterminées en fonction de l'amplitude et de l'heure de la marée afin de permettre la collecte des individus et les analyses durant la même journée. Brièvement, les myes récoltées étaient ponctionnées afin de récolter suffisamment d'hémolymphe pour évaluer la viabilité et l'aptitude des hémocytes à phagocyter des billes de latex fluorescentes. Ces analyses effectuées par cytométrie en flux ont également été exécutées suite à une exposition à différents métaux (CdCl_2 , HgCl_2 , PbCl_2) (Chapitre 2).

Le Fjord du Saguenay a été considéré comme seconde région pour étudier l'impact de la salinité et de la contamination sur les deux espèces sentinelles (Chapitre 3). Plusieurs études effectuées dans le Saguenay chez *Mya arenaria* ont permis l'identification de quatre sites d'intérêts contenant ces deux espèces. Parmi ceux-ci, deux sites de référence ont été retenus, soit l'Anse St-Étienne (ASE) et la Baie du Moulin à Baude (BMB), en raison de l'absence de contamination directe. La différence de salinité entre ceux-ci, soit 18 psu pour l'ASE et 28 psu pour la BMB, permettait d'évaluer l'influence de ce gradient sur ces deux espèces. Les deux autres sites, la Baie de Tadoussac (BT) et la Baie Ste-Catherine (BSC), étaient considérés contaminés par l'activité humaine de type industrielle, portuaire et municipale. Le choix de ces quatre

sites permettait d'évaluer l'influence de la salinité et de la contamination, tout en déterminant si l'immunité cellulaire de ces deux espèces était modulée différemment. Cette expérience s'est déroulée du 23 juin au 1^{er} juillet.

L'influence de la température sur *Mytilus edulis* a été évaluée en laboratoire avec la collaboration de l'Aquarium du Québec (Chapitre 4). Un système de filtration comprenant 4 bassins d'exposition a été construit dans lequel la température, la salinité et le pH pouvaient être modifiés et contrôlés précisément. Suite à différents ajustements, les moules ont été commandées chez un aquaculteur des Iles de la Madeleine (La Moule du Large) afin de s'assurer de la bonne santé des individus. Afin de mieux comprendre les variations immunologiques se produisant lors d'une hausse de température, l'état immunitaire des individus a été déterminé à 5°C, 10°C et 20°C. Avant l'envoi des moules, les valeurs de température et de salinité étaient transmises à l'Aquarium du Québec afin d'ajuster les paramètres physico-chimie de l'eau des bassins. La commande des organismes a été effectuée lorsque la température du site avait atteint la température minimale à tester (5°C). Suite à la réception des moules, celles-ci ont été acclimatées durant deux semaines pour une première analyse à 5°C. Par la suite, l'augmentation de la température a été effectuée progressivement (1°C/jour) sur une période de sept jours afin de d'éviter un choc thermique aigue. Lorsque la nouvelle température désirée était atteinte (10°C ou 20°C), l'état des organismes était évalué de nouveau. Finalement, les moules ont été conservées dans ces nouvelles conditions pendant quatre semaines. L'expérience s'est ainsi déroulée sur une période de 70 jours en excluant la période d'acclimatation initiale. Ce maintien prolongé était nécessaire afin d'observer si les températures entraînaient une modulation immunologique différente. Puisque cette expérience se déroulait uniquement en laboratoire, davantage d'analyses ont pu être effectuées que lors des études de terrain, permettant une meilleure connaissance de la modulation engendrée par la température. En résumé, un décompte hémocytaire a initialement été effectué, pour ensuite évaluer la viabilité et la compétence phagocytaire. Le pourcentage de cellules viables et leur aptitude à engouffrer des billes de latex ont également été évalués suite à une exposition *in vitro* afin de déterminer s'il y avait une variation de la sensibilité. De plus, l'activité des lysozymes (une enzyme antibactérienne), et de la

cyclooxygénase (COX :une enzyme pro-inflammatoire), ont été évaluées. Finalement, une dissection complète des individus a été effectuée afin de calculer divers indices nous informant sur l'état général des individus et de les sexer histologiquement à l'aide d'un échantillon de gonade. Pour chaque expériences, des individus de tailles, de poids et d'âges similaires ont été sélectionnés.

2.2 Méthodes d'analyses

Pour bien évaluer les modulations pouvant survenir chez un organisme, l'utilisation de biomarqueurs sensibles est généralement requis. Les différents biomarqueurs employés servent à évaluer la condition d'une espèce par le calcul de différents indices, ainsi que les modifications des compétences cellulaires ou physiologiques (Lam et Gray, 2003 ; van der Oost *et al.*, 2003). Toutefois, l'acquisition de connaissances sur la variabilité de ceux-ci est essentielle afin qu'il soit possible de distinguer un effet environnemental de celui provoqué par la présence de contaminants (Hylland, 2006). Ainsi, différents paramètres ont été évalués chez les bivalves *Mytilus edulis* et *Mya arenaria* afin de mieux comprendre de quelles façons ces espèces sont influencées par différentes variables environnementales et par la présence humaine. Les méthodes détaillées relatives à chaque expérience sont décrites dans les articles présentés dans les différents chapitres de ce mémoire.

2.2.1 Indices

Afin d'effectuer une évaluation rapide de l'état général ou physiologique d'un individu ou d'une population, le calcul de différents indices est fréquemment exécuté. Chez les bivalves, il est possible d'évaluer la condition générale (CI) des individus en fonction de la masse de tissus par rapport au poids total de l'organisme. Il est aussi possible d'évaluer sommairement la quantité de réserve nutritive (DGI) et l'état gonado-somatique (GSI) à la suite d'une dissection. Ces indices sont calculés par rapport au poids des organes désirés, soit la glande digestive ou les gonades, en fonction du poids de l'ensemble des tissus. Ces indices permettent d'avoir une indication rapide et

relative de la condition d'une population dans son habitat ou suite à une exposition en laboratoire (Cartier *et al.*, 2004 ; Pellerin *et al.*, 2009).

2.2.2 Immunité cellulaire

Du côté immunologique, plusieurs biomarqueurs ont été confirmés chez les bivalves afin de mieux comprendre comment ces organismes font face à la présence de pathogènes. En ce qui concerne la défense cellulaire, les principaux paramètres analysés sont le dénombrement des hémocytes, leur viabilité et leur compétence à phagocyter (Auffret, 2005). De ce fait, une attention particulière a été portée à ces différents biomarqueurs dans l'ensemble des travaux effectués en raison de leur sensibilité face aux variations naturelles ou anthropiques. La réalisation de ces différentes analyses a été effectuée par cytométrie en flux suite à un prélèvement d'hémolymphe dans le muscle abducteur. En raison de la capacité de cet appareil à distinguer les cellules en fonction de leur taille et de leur complexité, il est aisément possible d'effectuer un compte hémocytaire. L'ajout d'iodure de propidium permet d'évaluer le nombre d'hémocytes viables, alors que l'addition de microbilles de latex fluorescentes permet de connaître l'aptitude des cellules à phagocyter. Ces méthodes fréquemment utilisées en écotoxicologie ont d'ailleurs été validées, standardisées et même adaptées pour être effectuées en microplaque (Brousseau *et al.*, 2000 ; Blaise *et al.*, 2002). Ces différentes analyses ont également été effectuées suite à une exposition *in vitro* à différentes concentrations de métaux.

2.2.3 Enzyme de dégradation et pro-inflammatoire

Afin d'avoir une meilleure compréhension des impacts sur le système immunitaire, l'évaluation de l'activité d'enzymes de dégradation, tel que les lysozymes peut aisément être effectué. Cette enzyme antibactérienne peut être évaluée selon la méthode décrite par Lee et Yang (2002). Cette enzyme agit en provoquant l'hydrolyse des ponts glycosidiques de la paroi bactérienne, l'activité de ce biomarqueur peut facilement être évaluée par spectrométrie. Il en est ainsi puisque les valeurs d'absorbance réduiront dans le temps en fonction de la quantité d'enzyme présente dans l'hémolymphe des bivalves assurant la destruction des bactéries. La quantité de lysozyme dans

l'hémolymphe peut être modulée à la hausse ou à la baisse par différents facteurs, pouvant alors contribuer à une meilleure défense ou simplement démontrer une diminution ou inhibition de cette fonction (Li *et al.*, 2008 ; Gust *et al.*, 2012).

En raison du rôle clé de l'inflammation dans la réponse immunitaire, l'évaluation de la Cyclooxygénase (COX) permet d'avoir un aperçu du stress subi par l'organisme (Gagné *et al.*, 2015). Par contre, une hausse de cette activité peut également survenir afin d'assister certains processus physiologiques tels que la gamétogénèse et la ponte. Le suivi de ce biomarqueur peut permettre de mieux comprendre si la modulation est provoquée par des processus physiologiques ou par le stress subit.

Le sexage des différents individus a également été effectué à l'aide de coupes histologiques d'un morceau de gonade coloré avec de l'éosine et de l'hématoxyline. Certaines analyses ont été effectuées en fonction du sexe des organismes. En plus de l'identification du genre, il a été possible d'effectuer un suivi de la gamétogénèse par l'évaluation du stade de maturité des gonades (Ruiz *et al.*, 2011). Cette étape a pour but de mieux suivre et comprendre l'influence de ce processus sur la compétence immunitaire de *Mytilus edulis*.

3 DISCUSSION DE RÉSULTATS

Les résultats obtenus au cours de ces différents projets démontrent clairement que les facteurs environnementaux peuvent jouer un grand rôle dans la modulation immunitaire chez les bivalves, que ce soit en présence ou non de contaminants. L'influence de la marée en fonction du positionnement dans la zone littorale, de la salinité et de la température sont tous des paramètres pouvant influencer le système immunitaire des bivalves lorsqu'étudié individuellement.

3.1 Influence de la durée d'immersion (Chapitre 2)

En raison de la hausse prévue du niveau de la mer, conséquence des changements climatiques, il est important de vérifier comment les différents organismes de la zone littorale vont être aptes à faire face à ces variations. Les organismes sessiles, tels que les bivalves, risquent de voir leur durée d'immersion varier selon leur localisation. Cette modification pourrait alors provoquer une modulation de la réponse immunitaire de ces espèces sentinelles. Dans le cadre du programme IPOC (CRSNG-ANR), l'influence de la durée d'immersion sur l'immunité cellulaire a été évaluée chez la mye commune.

Afin de réaliser cette expérience, un inventaire de la mye commune a initialement été effectué à différents endroits dans la baie de Mitis. Cet inventaire effectué à marée basse a permis de déterminer les endroits où cette espèce était présente et sa densité approximative. Cet inventaire a été fait par une évaluation du nombre de trous de siphon présents par mètre carré. Il a été possible d'identifier trois sites potentiellement favorables à la récolte lors des grandes marées. Cette étape s'est déroulée sans problème jusqu'au moment des diverses récoltes effectuées durant les mois de juin et de juillet. Deux principaux problèmes sont survenus à ce moment. D'abord, malgré la présence de trous indiquant normalement la présence de cette espèce, les premières récoltes se sont avérées insuffisantes ou nulles dans la zone inférieure du littoral dans la majorité des sites. La durée planifiée initialement pour la collecte s'est également avérée trop courte pour permettre de prélever le nombre d'individu désiré avant le retour de la marée. Le temps alloué pour cette première étape de l'expérience a été

allongé d'une heure, réglant ce problème. Suite à diverses tentatives, une seule station s'est avérée favorable à la récolte dans les trois sections planifiées, soit le haut de plage, le milieu de plage et le bas de plage. Une fois de retour au laboratoire, les organismes étaient pesés, mesurés puis ponctionnés pour évaluer la viabilité des hémocytes et leur aptitude à phagocyter. Cette compétence a également été évaluée en présence de trois métaux, soit le cadmium, le plomb, et le mercure à des concentrations variant de 10^{-9} à 10^{-3} M. Les résultats obtenus démontrent que la défense cellulaire exercée par les hémocytes est moins efficace lorsque la durée d'exondation augmente, ce qui accroît les risques d'infection (Gagné *et al.*, 2008 ; 2009). Les cellules immunitaires des myes communes situées dans la zone supérieure du littoral démontrent une plus grande sensibilité lorsqu'exposées *in vitro* à différents xénobiotiques (CdCl_2 , HgCl_2 et PbCl_2). En raison de leur mode de vie sessile et de la hausse du niveau de la mer prédite par les changements climatiques, les bivalves pourraient voir leur durée d'immersion varier en fonction de leur localisation dans la zone littorale (IPCC, 2007). Cette variation pourrait ainsi avoir un effet bénéfique chez *Mya arenaria* (Davies et Pirie, 1980 ; Gagné *et al.*, 2008 ; 2009) que ce soit dans un habitat sain ou contaminé.

3.2 Influence de la salinité et de la contamination dans le Saguenay (Chapitre 3)

Une autre des perturbations potentielles des changements climatiques est une variation de la salinité provoquée par un changement du cycle de l'eau (évaporation/précipitation). De par leur grande répartition et leur présence à l'intérieur de marelles, les bivalves sont susceptibles d'être affectés par cette variation, qui pourrait également influencer leur aptitude à combattre un agent pathogène. Une expérience sur le terrain a été élaborée afin de comparer l'immunité cellulaire de la mye commune et de la moule bleue dans le Fjord du Saguenay en présence d'un gradient de salinité. De ce fait, deux sites de références ont été déterminés afin d'évaluer la l'immunocompétence de ces deux espèces dans des habitats où la salinité varie de 18 à 28 psu (ASE et BMB respectivement). La présence d'activité humaine, principalement au niveau de l'embouchure (l'estuaire, 28 psu) permet d'évaluer l'influence de la

contamination présente dans la Baie de Tadoussac et dans la Baie Ste-Catherine sur ces deux espèces bioindicatrice. L'utilisation de deux types de bivalves nous a également permis de vérifier si ces deux espèces sentinelles réagissent de manière semblable dans le même habitat. En raison de la grande distance à parcourir entre les différents sites et le lieu où le laboratoire de terrain a été établi, les analyses prévues le jour même ont dû être repoussées. Malgré cette légère réorganisation, tout s'est bien déroulé, notamment grâce à l'aide supplémentaire d'une employée du Parc Marin Saguenay Saint Laurent. Toutes les analyses ont alors été décalées afin d'uniformiser le tout et d'éviter d'ajouter un biais dans nos résultats. Suite à cette campagne d'échantillonnage, l'état de condition des différentes espèces a été évalué, en plus de la viabilité hémocytaire et de l'aptitude de ces cellules à phagocyter.

Les résultats obtenus au niveau immunitaire n'ont pas permis d'observer de variation chez la moule bleue entre les deux sites de références, alors qu'une différence a été constatée pour l'efficacité phagocytaire des hémocytes de la mye commune. En raison de cette modulation causée par la salinité, aucune comparaison n'a pu être effectuée chez *Mya arenaria* entre l'ASE et les trois autres sites sélectionnés. Lors de la comparaison entre BMB (site référence de l'estuaire), BT et BSC, il a été possible d'observer une modulation immunitaire uniquement chez *Mytilus edulis*. Cependant, cette variation n'est observable qu'entre les sites pollués bien que le type de contamination soit semblable. Par contre, lors de la comparaison avec ASE (18 psu) chez *Mytilus edulis*, il est possible d'observer une immunostimulation à BSC, alors qu'aucune différence n'est observée avec BT. Toutefois, il est important de prendre en considération que les processus chimiques, tels que la sorption et la désorption, peuvent influencer la qualité de l'habitat, la bioaccumulation et la réaction des différentes espèces (Levine, 1999).

L'utilisation de la mye commune et de la moule bleue a également permis de vérifier si la réaction de ces deux espèces bioindicatrices était similaire. Suite aux analyses, il a été possible de constater que ces deux bivalves réagissaient différemment dans les sites pollués et que leur choix dans les études écotoxicologiques est crucial. Les résultats de cette étude et les divers travaux en écotoxicologie avec différentes bivalves renforcent ce constat (Gardner et Thompson, 2001 ; Fournier *et al.*, 2002). L'utilisation

de *Mytilus edulis* est préférable pour évaluer l'impact des xénobiotiques présents dans la colonne d'eau, alors que pour avoir un constat plus général de la pollution de l'eau et des sédiments, l'emploi de *Mya arenaria* est plus adéquat (Pellerin et Amiard, 2009). Les résultats obtenus permettent de supposer que les variations de salinité pourraient provoquer diverses perturbations physiologiques en fonction de l'espèce d'intérêt et de l'importance de la variation (Stickle et Sabourin, 1979 ; Gardner et Thompson, 2001 ; Westerbom *et al.*, 2002 ; Bakhmet *et al.*, 2005 ; Braby et Somero, 2006 ; Bussell *et al.*, 2008). Toutefois, les populations utilisées à chaque site sont adaptées aux conditions environnementales respectives à leur habitat. D'autres études sur le terrain seraient nécessaires sur ces espèces afin d'appuyer les résultats obtenus. Une expérience réalisée en mésocosme serait intéressante, puisqu'elle permettrait d'évaluer l'impact d'une hausse de la salinité pour les espèces vivant à 18 psu et une réduction pour ceux demeurant dans l'estuaire (28 psu). Ce type d'expérience pourrait permettre d'exposer les organismes (*in vivo*) ou les hémocytes (*in vitro*) à différents xénobiotiques, permettant ainsi de prendre en compte l'impact de la variation des processus chimiques tel que mentionné précédemment.

3.3 Influence de la température (Chapitre 4)

Une autre conséquence potentielle des changements climatiques est la hausse de la température globale, soit de l'atmosphère et de l'océan (IPCC, 2007). Les bivalves vivants dans la zone intertidale seraient exposés à des températures de plus en plus chaudes qui pourraient affecter leur métabolisme et différents systèmes physiologiques (Morris et Corkum 1999 ; Lemaire *et al.*, 2006 ; Matozzo et Marin, 2011). Les moules bleues cultivées en aquaculture pourraient également être affectées, bien que celles-ci soient constamment submergées et soumises à des conditions plus stables. Pour cette raison, il est important de vérifier comment le système immunitaire de cette espèce réagit suite à un changement de température. Pour ce faire, des moules ont été achetées chez un aquaculteur des Îles de la Madeleine (La Moule du Large) afin de limiter les risques de biais causés par la contamination. Les moules ont été acquises lorsque la température du golfe du St-Laurent était de 5°C. Elles ont été placées

pendant deux semaines en mésocosme à cette température tout en respectant la salinité et le pH d'origine. Suite à cette acclimatation en bassins, un premier sacrifice (T0) a été effectué afin d'évaluer l'état général des moules, ainsi que leur compétence immunitaire à la température en milieu naturel (5°C). Suivant cette première étape, la température a progressivement été augmentée de 5°C à 10°C sur une période d'une semaine (T7) et maintenue à cette valeur durant quatre semaines (T35). La même procédure a été réalisée pour l'écart de 10°C à 20°C (de T42 à T70). L'évaluation de l'état général des moules et de leur compétence immunitaire ont été effectuées après chaque hausse (T7 et T42), mais également après avoir été maintenues à ces différentes conditions (T35 et T70). L'immunité cellulaire, exercée par les hémocytes et l'activité de deux enzymes importantes pour le maintien de l'homéostasie de ce système a été évaluée à chaque sacrifice.

Les résultats recueillis au cours de cette expérience ont permis de constater plusieurs variations significatives en fonction des différentes températures d'exposition. Cependant, les différences observées sont majoritairement associées à l'immunité cellulaire démontrant une viabilité inférieure lorsque les moules sont maintenues à 5°C et optimale lorsque la température était stabilisée après 4 semaines à 10°C et 20°C. Toutefois, la compétence phagocytaire des hémocytes ne suit pas la même tendance. En effet, les hémocytes démontrent une aptitude supérieure à la phagocytose lorsque les moules sont maintenues à la plus faible (5°C), mais également à la plus haute température (20°C). Bien que les valeurs inférieures aient été observées à 10°C pour la phagocytose, il s'agit de la seule température où une augmentation du nombre de cellules viables par millilitre d'hémolymphe a été observée. De plus, les hémocytes ont été exposés *in vitro* à différentes concentrations de cadmium afin d'observer l'effet d'une contamination sur leur viabilité et leur aptitude à phagocyter un corps étranger. Les résultats recueillis suite à cette exposition étaient semblables à ceux obtenus en absence de ce contaminant. Bien que la viabilité des hémocytes était plus faible à 5°C, leur aptitude à phagocyter demeurait significativement supérieure comparativement aux autres températures. Ces résultats démontrent que l'immunité cellulaire des moules bleues varie en fonction de la température afin de pouvoir répondre efficacement à la présence d'un pathogène. Des modulations immunitaires suite à des variations de

température avaient également été démontrées chez divers bivalves (Monari *et al.*, 2007 ; Matozzo et Marin, 2011 ; Matozzo *et al.*, 2012 ; Mosca *et al.*, 2013). Cependant, cette défense cellulaire est réduite lorsque les hémocytes sont soumis à la fois à un xénobiotique comme le cadmium et à une hausse de la température.

En ce qui concerne l'activité enzymatique, aucune différence n'a été observée au niveau de l'activité antibactérienne exercée par les lysozymes présents dans le plasma, tel qu'observé par Nilsen *et al.* (1999) et Lee *et al.* (2008). Par contre, l'activité de la cyclooxygénase a varié au cours de l'expérience, démontrant une hausse significative suite au maintien des moules durant un mois à 20°C. Une première hausse non significative a toutefois été observée suite à la conservation des organismes à 10°C pour cette même période. Toutefois, cette variation ne semble pas être liée à une variation de l'immunocompétence puisque le processus de ponte a débuté au même moment, soit après que les moules aient été maintenues dans des conditions stables et favorables à la reproduction de cette espèce (Gagné *et al.*, 2007). Cette observation permet néanmoins de reconfirmer que la température a une influence sur le déclenchement du processus reproductif de cette espèce (Lemaire *et al.*, 2006).

En raison des variations observées, il est difficile de conclure qu'une hausse de la température de l'eau engendrée par les changements climatiques aura un effet négatif sur la compétence immunitaire de *Mytilus edulis*. Par contre, les résultats obtenus démontrent que la résistance des hémocytes au cadmium est supérieure lorsque la température de l'eau est plus froide (5°C) tout comme leur aptitude à phagocyter. Ainsi, en cas de hausse prolongée de la température, la défense immunitaire des moules bleues pourrait alors être réduite en milieu naturel en raison d'une sensibilité accrue des hémocytes en présence de cadmium. Cependant, si la température demeure constamment plus élevée, il est possible que cette espèce puisse en bénéficier au niveau de sa capacité reproductrice (Lemaire *et al.*, 2006).

4 CONCLUSION

Suite à l'évaluation de ces différents paramètres environnementaux, il est possible de constater qu'une variation de la durée d'immersion, de la salinité et de la température peut entraîner une modulation de la compétence immunitaire des bivalves. Cependant, les impacts potentiels des changements climatiques pourraient se produire simultanément contrairement aux expériences effectuées considérant chaque paramètre individuellement. Il est également important de prendre en considération que les changements prévus (immersion, salinité, température, etc.) risquent de varier en fonction des conditions physico-chimiques respectives à l'habitat des différentes populations. De plus, la contamination des habitats aquatiques et marins causée par la présence humaine est très variable d'un milieu à l'autre. Cette contamination, combinée aux variations des conditions climatiques, pourrait avoir un impact distinct sur la défense immunitaire des bivalves. De ce fait, il serait important d'évaluer l'impact simultané de ces différents paramètres environnementaux, tout en exposant les organismes *in vivo* à divers xénobiotiques aux concentrations environnementales.

**Modulation immunologique chez les bivalves par l'environnement et
la contamination dans l'optique des changements climatiques :
Article**

5 CHAPITRE 2 : INFLUENCE DE LA DURÉE D'IMMERSION

5.1 Influence of tidal stress on the immunocompetence of hemocytes in soft-shell clam (*Mya arenaria*).

Influence de la marée sur l'immunocompétence des hémocytes de la mye commune (*Mya arenaria*)

Beaudry, A.^{1,2,3}, Brousseau-Fournier, C.^{1,2,3}, Alix, G.^{1,2,3}, Fortier, M.², Auffret, M.⁴, Brousseau, P.^{1,2,3}, Fournier, M.^{1,2,3}.

¹ Parc de la rivière Mitis, 900 Route de la Mer, Ste-Flavie, Quebec, Canada, G5H 3Z4

² INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7

³ Université du Québec à Rimouski, UQAR, 310 Allée des Ursulines, Rimouski, Quebec, Canada, G5L 3A1

⁴ Université de Bretagne Occidentale, 3 Rue des Archives, 29238 Brest, France

La majeure partie de la rédaction a été effectuée par Alexandre Beaudry, assisté par Gabrielle Alix et Claude Brousseau-Fournier à part égale. La planification et l'exécution de cette expérience ont été réalisées par ces trois auteurs afin d'assurer la disponibilité de tous. Marlène Fortier nous a fourni l'assistance technique nécessaire pour l'apprentissage des diverses techniques durant l'expérience, pour les analyses statistiques et pour la correction de cet article. Michel Auffret, Pauline Brousseau et Michel Fournier se sont assurés du bon déroulement de l'expérience, de l'analyse des résultats et de la rédaction et de la correction de l'article.

Cet article a été soumis dans le "Journal of Xenobiotics" et publié le 2013-12-03. Les modifications et corrections exigées avant la publication concernaient principalement la rédaction (syntaxe et terminologie) et quelques ajustements des figures. Quelques ajouts ont également été exigés telles que les coordonnées géographiques de la baie de Mitis (site d'échantillonnage) et de l'information concernant la taille et l'âge des organismes.

5.1.1 Résumé

Mya arenaria est un organisme filtreur de la zone intertidale ayant une répartition spatiale hétérogène. Du fait de sa grande répartition et son alimentation par filtration, *Mya arenaria* est un excellent bioindicateur du milieu. L'alternance des marées provoque chez la mye un stress hydrique plus ou moins important selon la position altimétrique dans la zone intertidale. Il a été clairement établi que les réponses au stress peuvent engendrer des atteintes à la compétence immunitaire rendant l'organisme plus susceptible à des infections et à des cancers. Cette étude évalue donc la variation des compétences immunitaires de *Mya arenaria* en fonction du stress hydrique subi selon le niveau altimétrique, dans trois stations de la Baie-de-Mitis situées dans l'Estuaire du St-Laurent. Une analyse du nombre d'hémocytes, de leur viabilité et de leur capacité phagocytaire effectuée par cytométrie de flux a permis de vérifier si le niveau altimétrique entraîne une variation immunologique. Les myes de haut de plage semblent avoir une compétence immunitaire plus faible en raison de la courte période d'immersion et de l'importance du stress hydrique subi. Les myes localisées à un niveau altimétrique inférieur (plus loin de la plage) subissent beaucoup moins l'impact de l'alternance des marées et présentent une capacité phagocytaire significativement supérieure à celle des individus situés dans le haut de la zone intertidale (plus près de la plage). Les myes subissant un stress hydrique plus intense ont une capacité phagocytaire significativement inférieure ce qui les rend potentiellement plus susceptibles de développer des infections et des cancers. Dans le cadre d'études écotoxicologiques futures, il sera important de sélectionner des organismes du même niveau altimétrique.

5.1.2 Introduction

By their large distribution in the intertidal zone and continuous exposure to different biotic and abiotic stress in water and sediments, molluscs, such as *Mya arenaria*, are good sentinel species of environment quality (Cooper et Knowler, 1992; Fournier *et al.*, 2001). To determine the impact of different stress, an evaluation of the alteration of the main immune function of hemocytes, phagocytosis, can be readily determine in these invertebrates (Fournier *et al.*, 2000). It has been shown that these stressors could impact on the effectiveness of the immune system in molluscs to fight against diseases (Malagoli *et al.*, 2007).

Indeed hemocytes, which are responsible for phagocytosis, are altered by various environmental factors such as salinity, temperature and pH modification (Fisher, 1988; Renwranz, 1990; Matozzo et Marin, 2011), by pathogens (Anderson *et al.*, 1992; Oubella *et al.*, 1993; Oliver et Fisher, 1999) and pollution (Renwranz, 1990; Anderson *et al.*, 1992; Coles *et al.*, 1994; Cheng, 1998; Fisher *et al.*, 1999; Sauvé *et al.*, 2002). Exposure to these multiple stresses affects the immune system of molluscs and could increase their susceptibility to develop infectious diseases and cancers (Blaise *et al.*, 2002). However, in terms of physical stress, the effect of tides in respect to the position of clams on the shore were rarely been taken into account in immunological research. The objective of the present study is to determine if the shore spatial distribution (upper, middle and lower shore), can also influence the phagocytic competence of soft-shell clams.

5.1.3 Methods

Animals

Clams were collected, at low tide at three different sites (Anse, Jardins, Motel) and at three altimetric distances from the shore (upper shore, middle shore and lower shore) in Mitis Bay (48° 40' N, 68° 00' W). Upper shore *Mya arenaria* were exposed to air for circa 5 hours, the middle shore for 2 hours and the lower shore individuals were exposed for 30 minutes.

Determination of phagocytosis

Hemolymph was extracted from the posterior adductor muscle using 3 ml syringe and 23 G needle and transferred on ice in tubes. Phagocytosis was monitored according to the method developed by our laboratory (Brousseau *et al.*, 2000). Hemocytes were mixed with yellow-green latex FluoSpheres (Molecular Probes Inc., Eugene, Or., USA) at a ratio of 1:100 (hemocytes:beads) in flat-bottom 96 wells plate. The mixtures were incubated at 20°C in the dark. After 18 hours, the supernatant was delicately removed by decantation. The cells were fixed with 0.5% formalin. Phagocytosis was measured by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, San Jose. Ca., USA). A total of 3 000 events were acquired for each sample and stored in the list mode data format. The data were then analysed, once displayed as two parameter complexity and cell size, in the process of gating the hemocytes population and as fluorescence (FL1) frequency distribution histogram for phagocytosis. The results of one bead and more represent the phagocytic activity and three beads and more represent the efficacy of phagocytosis. Data collection and analysis were performed with LYSIS-II program.

Statistical treatments

The effect of tides and shore locations were examined by ANOVA followed by Tukey's test for pairwise comparisons. Statistical analyses were performed using SigmaStat (version 3.5). Significance was set at $p < 0.05$.

5.1.4 Results

The phagocytic activity and efficacy of phagocytosis for the site Jardins in Mitis Bay, for three altimetrics levels (top, middle and bottom range) are presented in Figure 1. Note that soft-shell clams located in top and middle ranges have phagocytic activity significantly lower than those from bottom site (18.7% and 12.9% respectively). For the phagocytic efficacy, there is also a significant decrease in top and middle locations when compared to low location. Similar results were obtained for the other two sites.

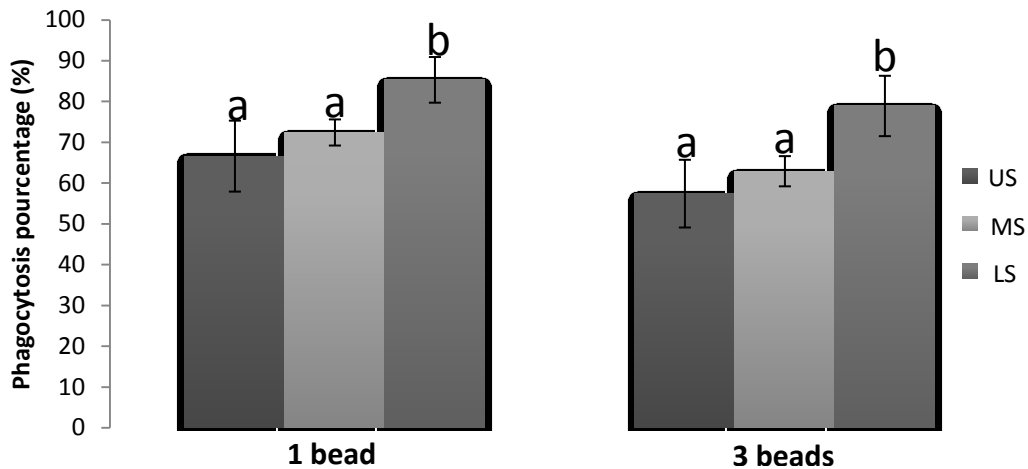


Figure 5.1 Phagocytosis activity (1 bead and more) and phagocytosis efficacy (3 beads and more) of *Mya arenaria* at upper shore (US), middle shore (MS) and lower shore (LS) from the site Jardins in Mitis Bay on July 31st 2012. (n = 15).

5.1.5 Discussion and conclusion

The distribution of *Mya arenaria* in intertidal zone is highly variable and has an influence on several physiological characteristics of this species. The immersion time, varies with the altimetric position on the shore and has an effect on the allocation of resources in relation to the ingested energy by filtration and the reproductive cycles (Hubbell, 1971; Calow, 1973; Calow, 1978; Barbault et Blandin, 1980; Roseberry *et al.*, 1991). Among all these physiological changes caused by the positioning in the intertidal area, we can now add the variation of immunocompetence as shown by our results, which tends to decrease with an extension of the period of desiccation.

It was also shown that increasing the immersion time changes adaptive strategies (Barbault, 1981; Roseberry *et al.*, 1991) to optimize the allocation of energy leading to altered growth of soft-shell clams (Barbault, 1981; Newell et Hidu, 1982). As preliminary results, in our experiment, we have also observed that clams collected lower shore, are at least one and a half fold bigger than those collected in upper shore. Based on our study, in future immunotoxicology studies, it would be important to include the natural variation of the phagocytic activity of soft-shell clams due to their position on the shore with a preference to do the sampling near the low water line to get the best witnesses.

5.2 Increase sensitivity to metals of hemocytes obtained from *Mya arenaria* collected at different distances from the shore

Augmentation de la sensibilité aux métaux des hemocytes de *Mya arenaria* récoltées à différentes distances de la rive.

Alix, G.^{1,2,3}, Beaudry, A.^{1,2,3}, Brousseau-Fournier, C.^{1,2,3}, Fortier, M.², Auffret, M.⁴, Brousseau, P.^{1,2,3}, Fournier, M.^{1,2,3}.

¹ Parc de la rivière Mitis, 900 Route de la Mer, Ste-Flavie, Quebec, Canada, G5H 3Z4

² INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Quebec, Canada, H7V 1B7

³ Université du Québec à Rimouski, UQAR, 310 Allée des Ursulines, Rimouski, Quebec, Canada, G5L 3A1

⁴ Université de Bretagne Occidentale, 3 Rue des Archives, 29238 Brest, France

La majeure partie de la rédaction a été effectuée par Gabrielle Alix, assistée principalement par Alexandre Beaudry et Claude Brousseau-Fournier dans une moindre mesure. La planification et l'exécution de cette expérience ont été effectuées par ces trois auteurs. Marlène Fortier nous a fourni l'assistance technique nécessaire pour l'apprentissage des diverses techniques durant l'expérience, pour les analyses statistiques et pour la correction de cet article. Michel Auffret, Pauline Brousseau et Michel Fournier se sont assurés du bon déroulement de l'expérience, de l'analyse des résultats et de la rédaction et de la correction de l'article.

Cet article a été soumis dans le "Journal of Xenobiotics" et publié le 2013-12-03. Les modifications et corrections exigées avant la publication concernaient principalement la rédaction (syntaxe) et quelques ajustements des figures. Quelques ajouts ont également été exigés, tel que de l'information concernant la viabilité des hémocytes lors des expositions et un tableau récapitulatif pour les trois xénobiotiques utilisés.

5.2.1 Résumé

L'immunotoxicologie est une discipline permettant de déterminer si certains facteurs biotiques et abiotiques affectent la capacité immunitaire d'organismes. La mye commune (*Mya arenaria*) est un mollusque filtreur de la zone intertidale dont l'immunité varie selon la localisation dans l'estran et les contaminants dans l'eau. Les myes communes subissent un stress hydrique lors des marées. Lorsqu'elles sont à découvert pour une plus longue période, elles sont plus susceptibles d'être affectées par des pathogènes ou des substances toxiques en raison de la sévérité du stress. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons récolté des myes réparties à différentes distances de la rive soient en bas de plage, en milieu de plage et en haut de plage. Les hémocytes de ces myes étaient alors exposés au chlorure de cadmium, au chlorure de mercure et au chlorure de plomb à des concentrations variant de 10^{-9} M à 10^{-3} M. Après une exposition de 18 heures, la capacité phagocytaire des hémocytes a été évaluée par cytométrie de flux. Les myes de haut de plage soumises à la présence de chlorure de cadmium phagocytent un nombre significativement plus bas de billes lorsque comparé aux sites se trouvant en milieu de plage et en bas de plage, et ce, pour des concentrations variant de 10^{-3} M à 10^{-7} M. Un même type de suppression de la compétence phagocytaire a aussi été observé pour le chlorure de mercure (10^{-3} M à 10^{-9} M). Les myes de haut de plage en présence de chlorure de plomb avaient une capacité immunitaire significativement plus faible. En résumé, nous avons démontré que le stress des marées, en plus d'influencer le niveau de compétence immunitaire des organismes, augmente la sensibilité des cellules à des xénobiotiques environnementaux.

5.2.2 Introduction

Biomarkers are used to measure the interaction between a stressor (physical, chemical or biological) and biochemical, cellular or physiological system, which initiate toxic events in organisms. Some biomarkers are good predictor of health in organism if the observed effects are irreversible or influences at higher level of biological organization. Among such biomarkers, organisms' health can be looked at by evaluating their immunocompetence (Perceval *et al.*, 2004; Gagné *et al.*, 2008; 2009).

Bivalve molluscs are good sentinel species because they are sessile and they are exposed directly in contaminated aquatic environment. Moreover, being filter-feeding organisms, they have the ability to bioaccumulate contaminants from water, sediments and particles from which they feed. In bivalves, hemocytes circulating in the hemolymph represent a key component of their immune system (Cheng, 1977; Adema, 1991; Sauvé *et al.*, 2002). One appropriate tool to evaluate their immunocompetence is through the evaluation of cell viability and phagocytosis activity (Gauthier-Clerc *et al.*, 2006; Gagné *et al.*, 2008)

In this study, the immunological response of soft-shell clams (*Mya arenaria*) collected at two distances from the shore was studied. Indeed, intertidal clams have to cope to anoxic periods and temperature changes, which thereby could increase their susceptibility towards contaminants. The objective is to determine whether clam's ability to resist to the toxic effects of various metals could be modulated by the distance between shore and sites collection, reflecting various time they spent in low tide.

5.2.3 Methods

Animals

Soft-shell clams were collected, at low tide at 3 sites (Jardins, Motel and Anse) and at 2 different distances from the shore (upper shore, middle shore) corresponding to circa 5 hours and 2 hours exposure to air in Mitis Bay (48° 40' N, 68° 00' W). The first site is our reference clean site, and the others two are sites intensively managed and numerous human activities were observed. Upon arrival to the laboratory, all bivalves

were transferred in containers with sea water and algae maintained at 4°C for 24 hours before starting the experiment.

Collection of hemocytes and exposure to metals

Hemolymph was extracted from the posterior adductor muscle using 3 ml syringe and 23 G needle. The metals used in this study were mercuric chloride (HgCl₂), lead chloride (PbCl₂) and cadmium chloride (CdCl₂) (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI., USA). Toxicants were all prepared at 0.1 M in deionised water. These stock solutions were made fresh for each experiment. Working solutions of each metal, ranging from 10⁻³ M to 10⁻⁹ M, were prepared by serial dilutions of stock solutions with hemolymph. Controls were obtained by incubating the cells with deionised water only. The cells were incubated at 20°C for 3 hours in 96-well plate. Then, fluorescently labeled latex FluoSpheres (Molecular Probes Inc., Eugene, Or., USA) were added in excess for 18 hours at 20 °C in the dark.

Determination of viability and phagocytosis

The viability was determined by flow cytometry using a Guava PCA flow cytometer and a Viacount kit (GuavaTechnologies, Hayward, CA, USA) according to the supplier's instructions. In addition, the mean percent viable cell was higher than 80% at the beginning of the *in vitro* exposure. Phagocytosis was monitored according to the method developed in our laboratory (Brousseau *et al.*, 2000). At the end of the incubation, the supernatant was delicately removed by decantation. Then the cells were fixed with 0.5% formalin in PBS. Phagocytosis was measured by flow cytometry with a FACScan (Becton Dickinson, San Jose. Ca., USA) whereas hemocyte populations were defined based on their forward and right angle scatter properties. A total of 3000 events were acquired for each sample and percentage of cells which have engulfed one bead and more (activity) and three beads and more (efficacy) were determined as fluorescence frequency distribution on FL1. Data collection and analysis were performed with LYSIS-II program.

Statistical treatments

The results were analyzed by ANOVA followed by a Tukey's test for pairwise comparisons. Statistical analyses were performed using SigmatSat (version 3.5) Significance was set at $P \leq 0.05$.

5.2.4 Results

Results of phagocytosis activity and efficacy obtained from clams collected upper shore and middle shore at the Motel site, following an *in vitro* exposure to mercuric chloride, are shown in Figure 1. Although there were no significant differences between upper shore and middle shore locations in the controls. However, hemocytes obtained from clams collected in upper shore were more sensitive to the toxic effect of mercury as shown by a significant suppression of phagocytic activity as well as efficacy for exposure to mercury at concentrations ranging from 10^{-8} up to 10^{-3} M.

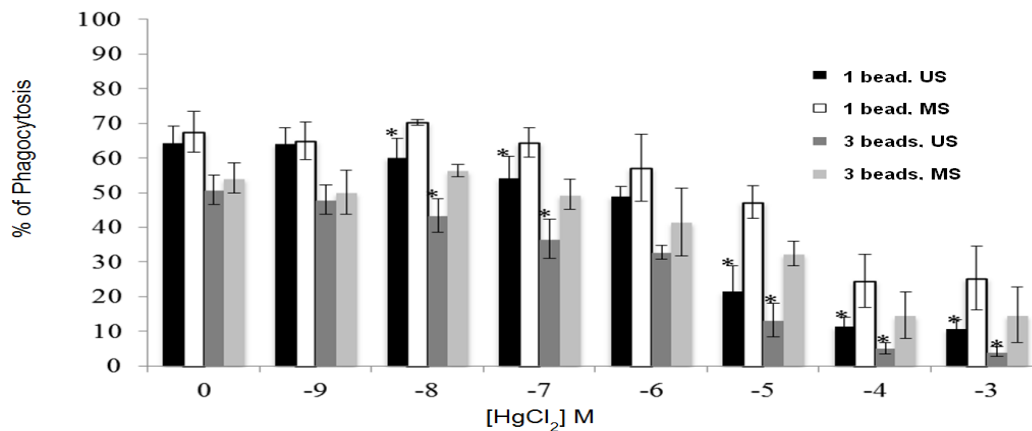


Figure 5.2 Phagocytosis activity (1 bead and more) and efficacy (three beads and more) of hemocytes obtained from *Mya arenaria* collected from middle (MS) and upper shore (US) at the Motel site in Metis Bay. Hemocytes were exposed to mercuric chloride at concentrations ranging from 0 up to 10^{-3} M. A significant suppression of phagocytic activity as well as efficacy was observed for hemocytes collected in the upper shore. (* $P \leq 0.05$).

A summary of the results of the phagocytosis obtained at the other two sites for Hg as well as results obtained with cadmium and lead, in which we compared upper to middle shore, are provided in Table 1. With the exception of lead at Motel site, there is a general trend towards significant decrease of phagocytic activity as well as efficacy in clams collected in upper shore in the same range of concentrations for Motel and Anse

sites. For the Jardins site, which is our reference clean site, significant reduction of phagocytosis was also obtained with the three metals in clams collected in upper shore. However, the suppression was observed at higher metal concentrations (10^{-5} M instead of 10^{-8} M).

Tableau 5.1 Summary of the results obtained for phagocytic activity and efficacy when results obtained in clams collected upper shore were compared to the clams collected at middle shore. Throughout the experiment, with the exception of lead at the Motel site, results obtained in clams collected in the upper shore were significantly lower than results obtained in clams collected in the middle shore.

	CdCl ₂	HgCl ₂	PbCl ₂
Jardins	↓	↓	↓
Motel	↓	↓	—
Anse	↓	↓	↓

5.2.5 Discussion and conclusion

It is already well documented that soft-shell clams immunocompetence is altered by pollution such as Hg, but this response could be also modulated by environmental stresses such as temperature, cyclic or tidal exposure to air (Beaudry *et al.*, 2013) and pathogens (Tremblay et Pellerin-Massicotte, 1997; Gagné *et al.*, 2009). In the present study, we wanted to evaluate the impact of exposure to air, during tidal events, on the sensitivity of hemocytes to metal exposures. This is the first time that impact of tides and exposure to air at low tide is shown in *Mya arenaria*. Upper shore soft-shell clams undergo more environmental stress since they are exposed for longer period to the air (see Materials and Methods section) than clams from middle shore. This could explain at least in part why those soft-shell clams have weaker immune system when exposed to metals. A possible explanation for this is that clams exposed to longer air-times endure more anoxic stress and bacteria could proliferate more when the temperature increases. We have found that hemocytes obtained from soft-shell clams, which are exposed to greater periods to air, are more sensitive to the toxic effects of metals. If this holds true, these clams would be the first to disappear upon pollution stress.

6 CHAPITRE 3 : INFLUENCE DE LA SALINITÉ ET DE LA CONTAMINATION DANS LE SAGUENAY (CHAPITRE 3)

6.1 Ecotoxicological evaluation of the immunocompetence of two bivalves species (*Mya arenaria* and *Mytilus edulis*) in the Saguenay fjord including a salinity gradient

Évaluation écotoxicologique de l'immunocompétence de deux espèce de bivalves (*Mya arenaria* et *Mytilus edulis*) dans le fjord du Saguenay en incluant un gradient de salinité.

Beaudry, A.^{1,2,3}, Lacaze, E.², Jobin-Piché, A.⁴, Masson, S.⁵, Auffret, M.⁶, Brousseau, P.^{1,2,3} Fournier, M.^{1,2,3}.

¹Parc de la rivière Mitis, 900 Route de la Mer, Ste-Flavie, Québec, Canada, G5H 3Z4

²INRS-Institut-Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

³ISMER-Université du Québec à Rimouski, 310 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada, G5L 3A1

⁴Parc Marin Saguenay St-Laurent, 91, rue Notre-Dame, Rivière-Éternité, Québec, G0V 1P0

⁵Aquarium du Québec, 1675 Avenue des Hôtels, Québec, Québec, Canada G1W 4S3

⁶Université de Bretagne Occidentale, 3 Rue des Archives, 29238 Brest,

La rédaction de cet article a été effectuée par Alexandre Beaudry secondé par Émilie Lacaze et Audrey Jobin-Piché. La planification de cette expérience a été effectuée par Alexandre Beaudry, Émilie Lacaze, Pauline Brousseau et Audrey Jobin-Piché du Parc marin Saguenay St-Laurent afin de faciliter l'accès aux différents sites. Pauline Brousseau et Michel Fournier se sont assurés du bon déroulement de l'expérience et de l'analyse des données acquises. Stéphane Masson, Michel Auffret, Pauline Brousseau et Michel Fournier ont révisé, commenté et corrigé l'article avant la soumission à l'éditeur.

Cet article a été soumis dans le "Journal of Xenobiotics" et publié le 2016-02-10. Les corrections exigées avant la publication concernaient la rédaction (syntaxe), la modification d'une figure et l'ajout d'information dans le titre. La suppression d'un tableau a été suggérée et le tableau a été remplacé par une explication sommaire en raison de l'absence de différence significative majeure. Finalement, le comité de révision du journal a demandé une explication supplémentaire concernant l'utilisation d'une référence concernant un processus chimique.

6.1.1 Résumé

L'état du fjord du Saguenay a été suivi attentivement de 1994 à 2007, en raison de la forte contamination anthropique et industrielle présente, pouvant affecter sa riche biodiversité. De par leur alimentation par filtration, les mollusques bivalves sont de bons bioindicateurs de la qualité de leur habitat et de l'environnement. Afin d'évaluer l'état des différents milieux, la mye commune avait alors été choisie comme espèce sentinelle en raison de sa grande distribution dans le Fjord. La moule bleue a été ajoutée à ce suivi afin de comparer l'état immunologique de ces deux espèces en raison de leur exposition distincte aux xénobiotiques, par les sédiments et/ou par la colonne d'eau. Quatre sites ont été sélectionnés dans la zone inférieure du Fjord (< 35 km de l'estuaire), dont l'Anse-St-Étienne (ASE) et la Baie du Moulin à Baude (BMB), désignés comme site de référence de la rivière Saguenay et de l'estuaire respectivement. Du fait de la variation de salinité entre ASE et les autres sites, l'impact de ce paramètre doit d'abord être évalué afin de faire une comparaison avec la Baie de Tadoussac (BT) et la Baie Ste-Catherine (BSC). Les analyses ont permis de constater que l'efficacité phagocytaire des myes est significativement réduite à ASE par rapport à BMB alors qu'aucun impact n'a été observé chez la moule. La comparaison avec les sites contaminés (BT et BSC) peut se faire entre tous les sites pour la moule bleue, mais ASE doit être exclue pour les myes. On constate alors une immunomodulation chez les moules entre la BT et la BSC, sans observer de différence chez la mye. Une variation de la réponse immunitaire est également observable entre ces deux espèces de bivalves, mais uniquement dans BT et BSC. Cette différence démontre que la réaction des ces deux espèces dans un même milieu peut varier en fonction de leur exposition et de leur tolérance respective face à différents xénobiotiques.

6.1.2 Introduction

Bivalves are filter feeders widely used in ecotoxicological monitoring because of their sensitivity to contaminants present in the environment (Blaise *et al.*, 2002; Pellerin et Amiard, 2009). Their immunity depends of their freely open blood cells which are directly in contact with xenobiotics make them good species to monitor environmental contamination. Decreased immunotoxicity can affect host resistance and result in an increase in disease incidence with potential effects at the population level, reinforcing the ecological relevance of studying this endpoint in bivalves (Galloway et Depledge, 2001). However, this endpoint can be subjected to natural variability related to environmental abiotic factors. The presence of two species of bivalves in the Saguenay Fjord, the soft-shell clam (*Mya arenaria*) and the blue mussel (*Mytilus edulis*), allows us to compare the immunological status of these two species.

The Saguenay Fjord is the main tributary of the St. Lawrence Estuary and has an important variation of salinity. This gradient allows the establishment of a rich biodiversity. However, it also limits the distribution of some species, such as *Mytilus edulis*, which is absent upstream of Anse St-Étienne (ASE), given that the salinity is under 18 psu. This tributary is also subject to various sources of contamination (Gagné *et al.*, 2006; Pellerin *et al.*, 2009). A complex mixture of urban, industrial and agricultural xenobiotics arising from upstream Saguenay watershed and atmospheric deposition contaminate the Saguenay-St.Lawrence (Gobeil *et al.*, 2005; Lebeuf et Nunes, 2005; Viglino *et al.*, 2006; Lemaire et Pelletier, 2013). Because of its industrial past, the sedimentary matrix of Saguenay is contaminated with toxic and potentially bioaccumulative substances like PAHs, heavy metals and TBT (Gagné *et al.*, 2006; Pellerin *et al.*, 2009; Pelletier *et al.*, 2009). In addition, municipal wastewater from local villages may not be properly treated and flows directly into the watershed (Dionne, 2001; Lemaire et Pelletier, 2013). It is therefore crucial to assess the toxicity of all these xenobiotics on sentinel species. In this context, we have assessed the immunological response of two bivalves: the soft-shell-clams and the blue mussels and compared their status according to the sampling site.

We first evaluated the impact of the salinity on the immunocompetence of *M. edulis* and *M. arenaria*, between two reference stations (Gagné *et al.*, 2008), ASE (18 psu) and Baie du Moulin à Baude (BMB) at salinity corresponding to the estuary (28 psu). Then, we compared the impact of corresponding harbors in two bivalve species with different habitats.

6.1.3 Methods

Site location of bivalve collection

Bivalves were collected in 2013 at 4 different stations (ASE: Anse Saint-Étienne, BMB: Baie du Moulin-à-Baude, BT: Baie de Tadoussac, BSC: Baie Sainte-Catherine) in the Saguenay River, Quebec, Canada (48° 15' N 70° 09' W) (see Figure 1). ASE and BMB were not exposed to any direct contamination (reference sites) but differed in salinity at 18 and 28 part per thousand respectively. The other two stations, BT and BSC were the two polluted stations because of the intensive commercial and recreational boating activities (Gagné *et al.*, 2006; 2008). At each site, 15 clams and 15 mussels were sampled and maintained at 4°C in icebox.

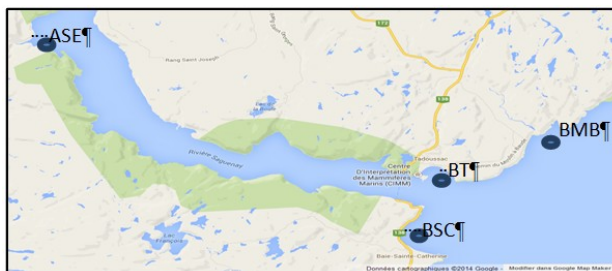


Figure 6.1 Map of the study area showing the 4 sites where bivalves were sampled. BT: Baie de Tadoussac, BSC: Baie Sainte-Catherine, BMB: Baie du Moulin-à-Baude, ASE: Anse Saint-Étienne.

Viability and phagocytosis assessments

Hemolymph was extracted from the adductor muscle using 3 mL syringe with 23 G needle. The viability was determined by flow cytometry using a BD Accuri™ C6 (Becton Dickinson, San Jose, Ca., USA) and by propidium iodide (PI) staining. Phagocytosis was evaluated according to the method developed by our laboratory (Brousseau *et al.*, 2000). Briefly, hemocytes were mixed with yellow-green latex FluoSpheres (Molecular

Probes Inc., Eugene, Or., USA) at a ratio of 1:100 (hemocytes:beads) in flat-bottom 96 wells plate. The mixtures were incubated at 20°C in the dark. After 18 hours, the supernatant was delicately removed. The cells were fixed with 200µL of 0.5% formalin in sterile water. Phagocytosis was measured by flow cytometry, BD Accuri™ C6 following the analysis of hemocytes according to their scattering properties of forward and right angle. A total of 3000 events were acquired to analyse fluorescence frequency distribution on FL1 and determined phagocytic activity (one bead and more) and phagocytic efficacy (three beads and more). Data collection and analysis were performed with BD Accuri C6 software.

Statistical analysis

The difference between each station in the Saguenay River was evaluated by ANOVA followed by Tukey’s test for pairwise comparisons. Statistical analyses were performed using SigmaStat (version 3.5). Significance was set at $p < 0.05$.

6.1.4 Results

The hemocytes viability of each species was not significantly different for both species between ASE and BMB. However, the phagocytic activities significantly differed for *Mya arenaria*. No variations were observed for *Mytilus edulis* in salinity gradient (see Figure 2).

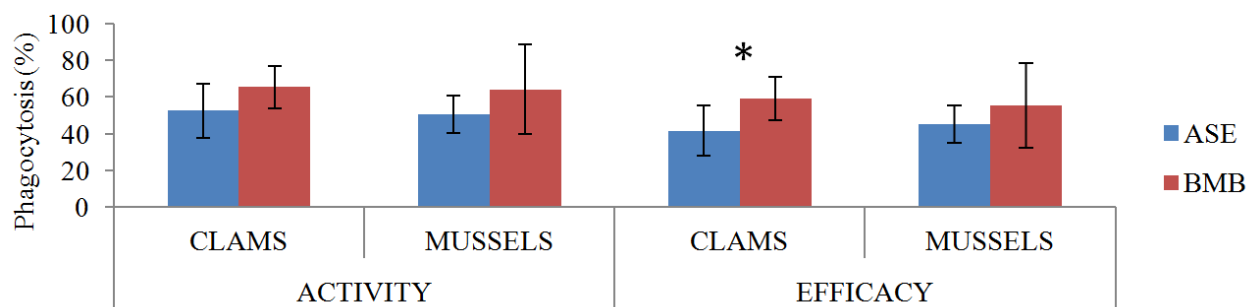


Figure 6.2 Phagocytic activity (1 bead and more) and efficacy (3 beads and more) of *Mya arenaria* (n = 15) and *Mytilus edulis* (n = 15) from two reference stations in the Saguenay River in a salinity gradient (ASE; 18 psu and BMB; 28 psu). (* significant difference between station, $p < 0.05$)

The hemocytes viability and phagocytosis were then evaluated for the polluted stations (BT and BSC) compared with reference stations but only with BMB for *Mya arenaria*

because of salinity impact observed in Figure 3. For both species, no variations were observed in the hemocytes viability despite the anthropic activities and known contamination present at BT and BSC. For *M. arenaria*, no differences were observed in hemocytes phagocytic activity and efficacy, but significant variation occurs for *M. edulis*. This variation was observed between ASE and only one polluted station (BSC), where the phagocytosis significantly increased. However, no modulation of the phagocytic competence have been observed when BMB was compared with BT and BSC for both species. On the other side, the phagocytosis of mussel hemocytes of the two polluted stations differs significantly and was increased at BSC (see Figure 3).

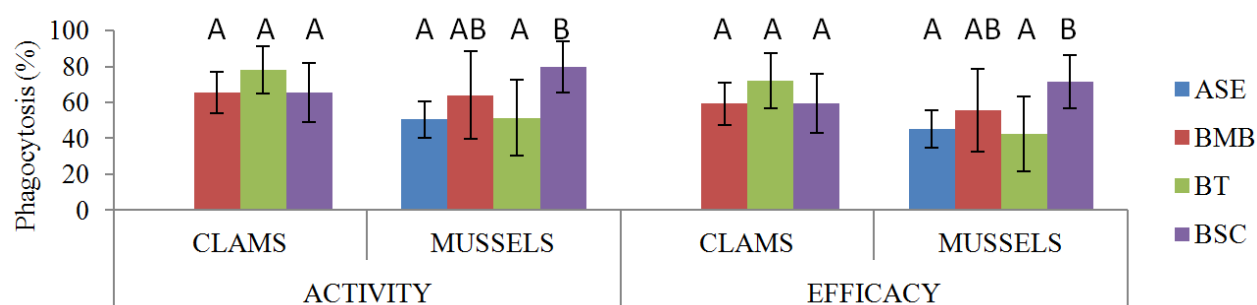


Figure 6.3 Phagocytic activity (1 bead and more) and efficacy (3 beads and more) of *Mya arenaria* (n = 15) from three stations and *Mytilus edulis* (n = 15) from four stations in the Saguenay River (ASE is excluded for clams because of the modulation induced by the salinity gradient, see Figure 1) (p<0.05)

The hemocytes viability and phagocytosis of each species were compared to determine the immunological modulation at each station. In the reference stations, ASE and BMB, no significant differences were observed between clams and mussels. In contrast, the hemocytes viability showed no differences in contaminated stations, at BT and BSC, but the immune response was significantly modulated. In BT, the phagocytic competence of soft-shell clams was higher than for mussels. In BSC, mussels' hemocytes had higher phagocytic capacity (1 bead and more) but no differences other were observed for the phagocytic efficacy (3 beads and more).

6.1.5 Discussion and conclusion

The large distribution of bivalves in the intertidal zone and in the Saguenay makes them good species to follow environmental conditions and contamination. However, the impact of xenobiotics must be evaluated for each species because they are not subject

to the same types of exposure (Vasseur et Cossu-Leguile, 2006; Gagné *et al.*, 2008). The analysis of the immune-modulation in field studies is complex due to the multitude of confounding factors in the habitat of these species may influence this reaction (Vasseur et Cossu-Leguile, 2006; Gagné *et al.*, 2008). In this study, we want to assess the immunomodulation of *Mytilus edulis* and *Mya arenaria* in four different stations in Saguenay Fjord including a salinity gradient between two reference stations. By this investigation, we initially evaluated the impact of this confounding factor, then the anthropic pollution impact in BT and BSC and finally, if both species showed the same immunological response.

The reduction of salinity is already known to induce many physiological change like growth rate (Westerbom *et al.*, 2002), heart rate (Bakhmet *et al.*, 2005; Braby et Somero, 2006), respiration (Stickle et Sabourin, 1979) and energy acquisition (Gardner et Thompson, 2001; Bussell *et al.*, 2008). Moreover, a reduction of salinity from 32 psu to 16 psu induced a decrease in the immune response of mussels in controlled conditions (Bussell *et al.*, 2008). However, our results demonstrate no significant difference between ASE (18 psu) and BMB (28 psu) for this species (see Figure 2). This may be explained by the natural adaptation of the mussels from ASE. In contrast, the soft-shell clams hemocytes phagocytic efficacy is significantly lower at ASE (see Figure 2). Despite this observed modulation in hemocytes, there are no differences between the immune response of these two bivalves at ASE and BMB.

In contaminated stations, it is noteworthy that *Mya arenaria* and *Mytilus edulis* seem to be affected differently by the xenobiotics present in the environment, principally at BT. This variation may be caused by a difference in sensitivity for each species facing contamination (Fournier *et al.*, 2001), but also by the difference in the way of exposure to xenobiotics (Pellerin et Amiard, 2009). Indeed, *Mya arenaria* is exposed directly to sediments and water column contaminants, while *Mytilus edulis* is only exposed to the xenobiotics when filtering water (White *et al.*, 1997; Gagné *et al.*, 2006; Pellerin et Amiard, 2009; Pellerin *et al.*, 2009). Furthermore, the properties of some xenobiotics can change with salinity and affect their biodisponibility enable them to be absorbed by the sediments particles and accumulate in the organisms (Levine, 1999). Because of this chemical variation, all comparisons with ASE, need to be done with a lot of

cautiousness despite the absence of immunological variation in the salinity gradient for mussels (see Figure 2). Indeed, both species absorb contaminants in their tissues by filtering water, but the clams also accumulate them through direct contact with sediment and porewater (Levine, 1999) resulting in increased transfer (Fournier *et al.*, 2002). The sediment matrix in the Saguenay Fjord is more heavily polluted than the water column for a given station, thus exposing the clams to a broader range of contaminants with higher concentrations (Pelletier *et al.*, 2009).

In this study, we demonstrated that mussels living in natural environment and exposed to different salinity (18 psu and 28 psu) adapt their immunocompetence and show no difference in basal immunocompetence. However, the clam is slightly affected by this salinity reduction by a decreased in their phagocytic efficacy. Moreover, stations heavily affected by human activities (BT and BSC), reveal a clear different modulation of the phagocytosis between clams and mussels, highlighting their own sensitivity to pollution. This shows the relevance of using multiple sentinel species in field studies to have a better overview and comprehension of the impact of human activities.

7 CHAPITRE 4 : INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

7.1 Influence of temperature on immunocompetence of blue mussels (*Mytilus edulis*)

Influence de la température sur l'immunocompétence de la moule bleue (*Mytilus edulis*).

Beaudry, A.^{1,2}, Fortier, M.¹, Masson, S.², Auffret, M.⁴, Brousseau, P.^{1,3} Fournier, M.^{1,3}.

¹INRS-Institut-Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

²Aquarium du Québec, 1675 Avenue des Hôtels, Québec, Québec, Canada G1W 4S3

³ISMER-Université du Québec à Rimouski, 310 Allée des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada ^{G5L 3A1}

⁴Université de Bretagne Occidentale, 3 Rue des Archives, 29238 Brest

La rédaction de cet article a été effectuée par Alexandre Beaudry. La planification, l'organisation et le bon déroulement de la partie laboratoire de cette expérience a été accompli par Alexandre Beaudry avec la collaboration de Marlène Fortier. L'élaboration et le bon fonctionnement des mésocosmes à l'Aquarium du Québec a été assuré majoritairement par Stéphane Masson. Tous les auteurs ont révisés, commentés et corrigés l'article avant la soumission.

Cet article a été soumis dans le "Journal of Xenobiotics" le 2016-03-15.

7.1.1 Résumé

La moule bleue est un mollusque bivalve fréquemment utilisée dans le cadre de suivis écotoxicologiques en raison de sa grande répartition et de son mode d'alimentation par filtration. En raison des changements climatiques et de la hausse de la température attendue dans le milieu marin, il est important d'anticiper les impacts potentiels sur cette espèce et les répercussions qui pourraient en résulter, tant au niveau écologique qu'économique. La compétence immunitaire de cette espèce a été évaluée après un maintien en mésocosme à 5°C, 10°C et 20°C et suite à une exposition *in vitro* des hémocytes au cadmium. Les résultats obtenus démontrent une modulation de la viabilité hémocytaire et de l'aptitude de ces cellules à phagocyter en absence de contaminant. Lors de l'exposition au cadmium, les hémocytes démontrent une plus forte résistance à 5°C, tout en maintenant une compétence phagocytaire supérieure. L'activité des lysozymes est demeurée stable à toutes les températures testées contrairement à celle de la cyclooxygénase qui a augmentée lors du maintien des organismes à 20°C.

7.1.2 Introduction

Sentinel species such as bivalves are commonly used in surveys because of their sessile lifestyle, their wide geographical repartition and their food intake through filtering water column (Bussell *et al.*, 2008; Alix *et al.*, 2013). Given their filter feeding ability, mussels like *Mytilus edulis* can bioaccumulate xenobiotics which may affect many physiological systems such as immune system (Bussell *et al.*, 2008; Alix *et al.*, 2013). For this species, one of the main defense mechanism against pathogens is phagocytosis, carried out by hemocytes circulating freely in the hemolymph (Matozzo *et al.*, 2012; Alix *et al.*, 2013; Mosca *et al.*, 2013) which are recognized to be a useful tool for biomonitoring (Lemaire *et al.*, 2006). Another efficient immune response of bivalves against pathogens is the production of lysozyme (Mydlarz *et al.*, 2006; Gust *et al.*, 2012). This hemolymph circulating enzyme is secreted following recognition of bacteria or physiological stress (Gust *et al.*, 2012). This enzyme is also known to have digestive function against ingested bacteria, representing both a threat and possible source of food (Nilsen *et al.*, 1999; Mydlarz *et al.*, 2006). The lysozyme catalyses the hydrolysis of muramic acid of bacteria glycosidic bonds (Lee et Yang, 2002). Moreover, a stressful condition can modulate the production of prostaglandins or other inflammatory mediators (Gagné *et al.*, 2015). The inflammation level can be assessed by measuring the degradation of the arachidonic acid by the cyclooxygenase (COX) activity (Gagné *et al.*, 2015) known as a rate-limiting enzyme of production of prostaglandins (Rowley *et al.*, 2005). An increase of pro-inflammatory precursors by COX activity aims to sustain the immune response (Auffret, 2005) leading to hemocyte bactericidal activity (Gust *et al.*, 2012). Furthermore, the COX activity increases progressively during the final maturation of gonads to reach the highest level during the spawning process (Gagné *et al.*, 2007). To improve our comprehension of bivalve's response in a contaminated habitat, it is crucial to understand how the mussels modulate their immunity to face natural challenges such as temperature variations.

Several studies were performed to investigate the effects of environmental factors such as salinity (Bussell *et al.*, 2008), temperature (Seed, 1976; Maug myint et Tyler, 1982; Thompson, 1984; Lemaire *et al.*, 2006), hydrodynamic factor (Seed, 1976; Lemaire *et*

al., 2006), phytoplankton concentration and food intake (Seed, 1976; Cartier *et al.*, 2004; Lemaire *et al.*, 2006) on different physiological aspect of *M. edulis* (Seed, 1976; Maug myint et Tyler, 1982; Thompson, 1984; Cartier *et al.*, 2004; Lemaire *et al.*, 2006; Bussell *et al.*, 2008). However, the influence of temperature on bivalve immunity in controlled conditions have been investigated only on a limited number of species including *Chamelea gallina* (Monari *et al.*, 2007), *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2006; Matozzo *et al.*, 2012) and *Crassostrea gigas* (Gagnaire *et al.*, 2006; Mosca *et al.*, 2013). The influence of temperature on *M. edulis* was evaluated but only in the context of a stress on stress protocol including a pathogen (Hernroth, 2003) and a xenobiotic (Parry et Pipe, 2004).

Therefore, this paper aims to determine how *M. edulis* can modulate its immune system when exposed to different temperatures *in vivo* (5°, 10° and 20°C) and combined to an *in vitro* cadmium exposure.

7.1.3 Methods

Animals

M. edulis were bought from a mussel farm, located in Quebec (La moule du large, Îles de la Madeleine, QC, Canada, 47°23'N 61°52'W). For each part of the experiment, 30 mussels were sampled to assess their general condition through indices analysis and immunological responses including cellularity, viability of hemocytes and the phagocytosis activity.

Experimental design

The mussels were bought in December, when water temperature was at 5°C and were kept in mesocosm at the field conditions (temperature, salinity, and pH). After 2 weeks of acclimatization (T0), the temperature was increased to reach 10°C after 7 days (T7) then, maintained in this condition for 28 days (T35). Subsequently, the temperature was increased again to reach 20°C by raising it 2°C per day during a week (T42). The mussels were kept again at 20°C for another 28 days (T70). At the end of each condition (acclimatization or raise of temperature), 30 mussels were sacrificed to perform the analysis.

Index analysis

Three indices were evaluated: the hepato-somatic index (DGI), the gonado-somatic index (GSI) and the condition index (CI). DGI was calculated based on the digestive gland mass on the total soft wet tissue mass (Cartier *et al.*, 2004), GSI using the gonad mass on the total mass of soft wet tissue (Pellerin *et al.*, 2009) and CI was calculated by dividing the weight of wet tissue by the total mass (Cartier *et al.*, 2004; Pellerin *et al.*, 2009).

Cellularity, Viability and Phagocytosis

Before dissection of mussels for index analysis, hemolymph was extracted from the adductor muscle using a 3.0 ml syringe and a 23 G needle. The cellularity and viability were determined by adding of propidium iodide (PI 1 µg/ml) to the cell suspension and analysed by flow cytometry using a FacsCalibur (Becton Dickinson, San Jose. Ca., USA). The phagocytosis was evaluated by mixing yellow-green latex FluoSpheres (Molecular Probes Inc., Eugene, Or., USA) with a volume of 500 µl of hemolymph containing 100,000 non-exposed viable cells or, after 3 hours of exposure with cadmium chloride (CdCl₂) at different concentrations ranging from 0 to 10⁻³M. The ratio hemocytes:beads was kept at 1:100. After 18 hours of incubation, in the dark at 20°C, the mixture was delicately transferred on a 3% BSA gradient prepared in RPMI-1640 supplemented with 3% of sea salt. The tubes were centrifuged at 125 g for 8 minutes to remove free beads. Then, supernatant was removed and hemocytes resuspended in artificial sea salt solution containing 0.5% of paraformaldehyde and 0.2% of sodium azide. The phagocytic capacity (1 bead and more) and efficacy (3 beads and more) were measured by flow cytometry. A total of 5000 events were recorded for each sample. Data collection and analysis were performed with Cell Quest Pro software.

Lysozyme activity

The lysozyme activity was measured in 100 µl hemolymph plasma with 100 µl of *Micrococcus lysodeikticus* prepared at 0.4 mg/ml in a 100 mM phosphate buffer at pH 6.2. Absorbance was immediately measured at 450 nm with a microplate reader Synergy4 (Software: Gen5 V:2.05) and then every minute after the initial reading for a total of 5 minutes. The decrease in absorbance at 450 nm/min was than calculated like

previously described by Lee and Yang (2002). A unit of lysozyme activity is defined as the quantity of enzyme which causes a decrease of 0.001 per minute in absorbance at pH 6.2 at 25°C. All lysozyme and protein measurements were done in 96-well plates in duplicates. Chicken egg lysozyme (Sigma, On, Canada) was used for calibration and the results expressed were standardized by the protein concentration in hemolymph using the protein dye binding method.

Inflammation level

Cyclooxygenase (COX) activity was measured as described by Fujimoto *et al.* (2002), using the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate in the presence of arachidonate. Briefly, hemocytes were resuspended in 150 µL of pre-diluted PBS (1/4) and 25 µL of this cell suspension was mixed to 150 µL of reaction media. The reaction media was composed of 50 mmol/L Tris– HCl, pH 8.0, containing 0.05% Tween-20, 50 µmol/L arachidonic acid, 2 µmol/L dichlorofluorescein and 0.1 µg/mL horseradish peroxidase. The fluorescence readings were taken at 0, 3, 6 and 12 minutes at 25°C using 485 nm excitation and 530 nm emission wavelength (Synergy4, Gen5 V2.05). The data were expressed in relative fluorescence units/min/mg of protein.

Histological sex identification

The sex and gametogenic stage were determined histologically for each mussel using a section (0.5 X 0.5 cm²) of the central part of the gonad. The mantle section was fixed in Bouin solution, then dehydrated and embedded in paraffin. Slices of 5 µm thick were mounted on a microscope slides and stained with hematoxylin/eosin. Maturation stage was determined and used to calculate a distinct maturity index for females and males (Lemaire *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2011).

Statistical analysis

ANOVA followed by Tukey's test for pairwise comparisons were applied. Statistical analysis were performed using SigmaStat (version 3.5). Significance was set at $p < 0.05$.

7.1.4 Results

Indices

All the results for the indices are presented in Figure 1. For DGI, the digestive gland weight was stable for the first 35 days corresponding to about 8% of the soft wet tissue. After 42 days, the weight of this organ declined significantly representing only 6% of the tissue mass. After 70 days, the DGI decreased at 5%, which was not enough to be significantly different of results obtained at T42 but still significantly smaller T0 to T35 days of experiment.

For GSI, the gonad weights were at their maximum at T0 and T7, representing 16 and 15% of the tissue mass respectively. After 28 days at 10°C (T35), the GSI value decreased significantly until the end, reaching 12% at T35, 11% at T42 and finally 7% (T70) of the tissue mass.

For the CI, no significant changes were observed during the experiment.

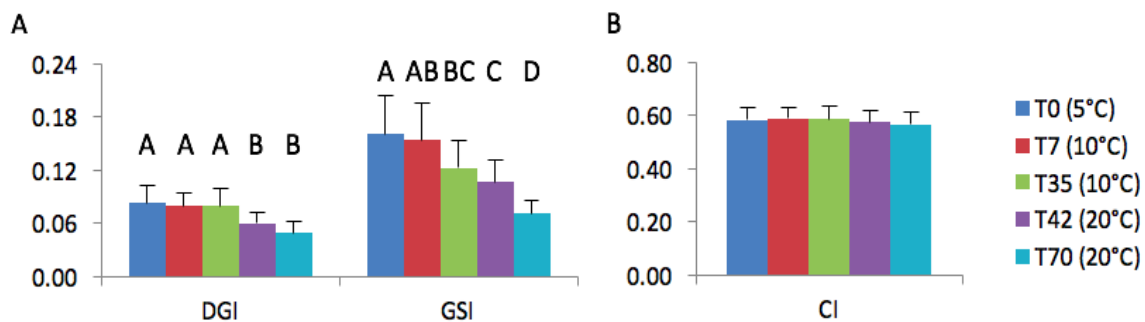


Figure 7.1 Variation of relative weight of digestive gland (DGI) and gonads on total soft tissue (A) and Condition Index (CI) (B) during the experiment (n = 30/sacrifice, p < 0.05)

Viability and Phagocytosis

For viability and phagocytosis, the results are presented in Figure 2. At 5°C, hemocyte viability was at its lower value reaching only 55.9% of viable cells. By increasing the temperature, the viability increased but not significantly at T7 (62.8%) but became significantly higher after 28 days at 10°C to attain 75.5%. During the temperature modification up to 20°C (T42), the viability slightly went down but not significantly and

returned to the highest value after being kept in stable condition for another 28 days (T70).

The phagocytic activity of hemocytes reached an optimal value at 5°C (T0) and at 20°C (T42 and T70), with the exception of the phagocytic efficacy at T70, showing no significant differences. At 10°C (T7 and T35), the phagocytic capacity and efficacy were stable and significantly lower.

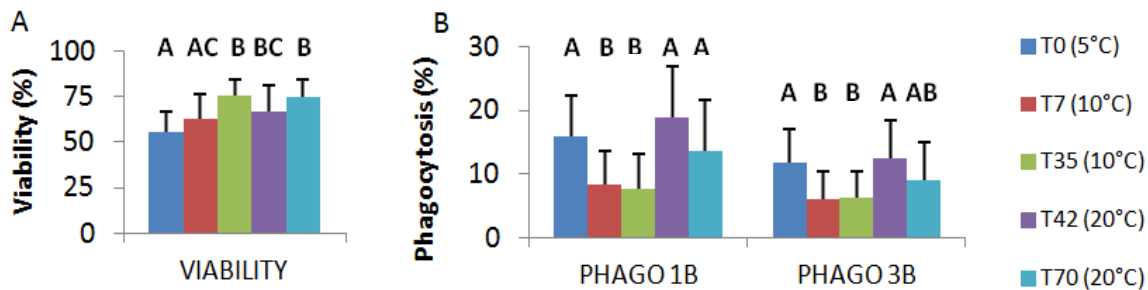


Figure 7.2 Hemocytes viability (A), phagocytic capacity (1 bead and more) and efficacy (3 beads and more) (B) of *M. edulis* expose to different temperature (n = 30/sacrifice, p<0.05)

Cadmium exposure: Viability and Phagocytosis

For cadmium exposures, the results are presented in Figure 3. For all CdCl₂ exposures, except for 10⁻³M where the hemocytes viability decreased significantly, the percentage of viable cells was significantly lower when mussels were maintained at 5°C, except at T35. The highest phagocytic activity was obtained when the mussels were kept at 5°C (T0) and the lowest values after the increased of temperature to 10°C (T7). After 28 days at 10°C (T35), the phagocytic activity reached an intermediate value which remained relatively stable until the next time (T42). Then, there were no other changes for the remaining of the experiment (T70).

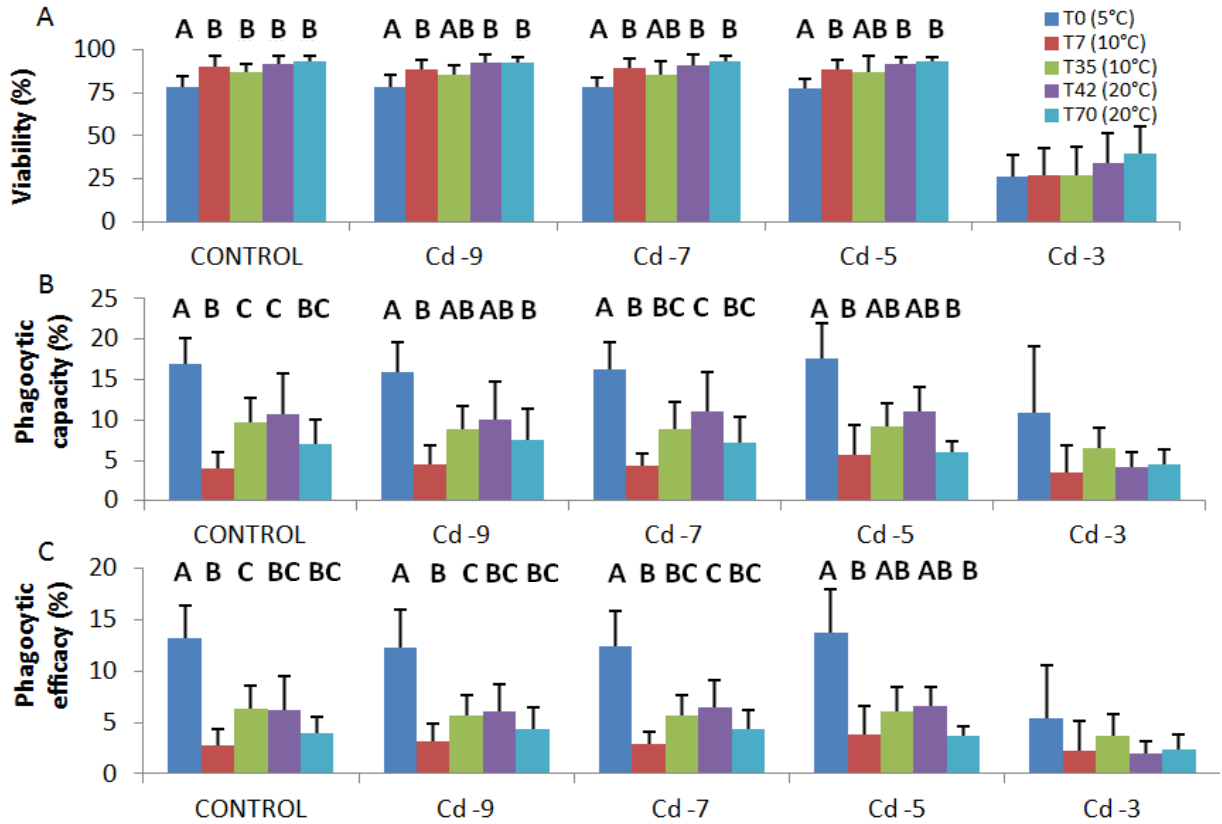


Figure 7.3 Hemocytes viability (A) phagocytic capacity (1 bead and more) (B) and efficacy (3 beads and more) (C) of *M. edulis* exposed to different temperatures. Hemocytes were challenged *in vitro* with cadmium chloride at concentration ranging from 0 to 10^{-3} M (n = 6-8/sacrifice, p<0.05)

Lysozyme and cyclooxygenase activity

For the lysozyme and the cyclooxygenase activity, the results are showed in Figure 4A and 4B respectively. During all the experiment, there was no significant modulation of the lysozyme activity by temperature.

For the cyclooxygenase activity, the results showed an increase after being kept at the same temperature for a month (T35=10°C and T70=20°C) with a significant difference only at T70. During the temperature modifications (T7 and T42), there is no significant difference with the control (T0).

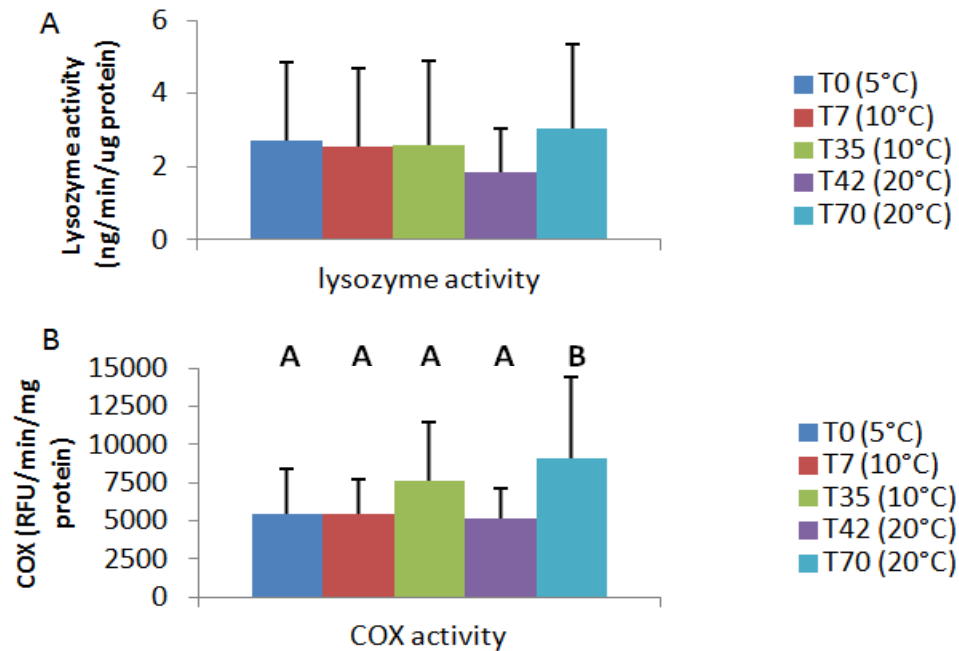


Figure 7.4 Lysozyme activity in cell-free hemolymph (A) and COX activity on hemocytes (B) of *Mytilus edulis* exposed to different temperatures (n = 30/sacrifice, p<0.05)

Gender difference and sexual maturity

No significant differences were observed between genders for all cellular and molecular analysis performed during the experiment. For sexual maturation of *M. edulis*, the results in Figure 5 demonstrate a clear progression in the gonads development of both sexes. At the beginning of the experiment (T0), the male gametes were more mature than female until T35, when the sexual maturation of females and males showed no more differences.

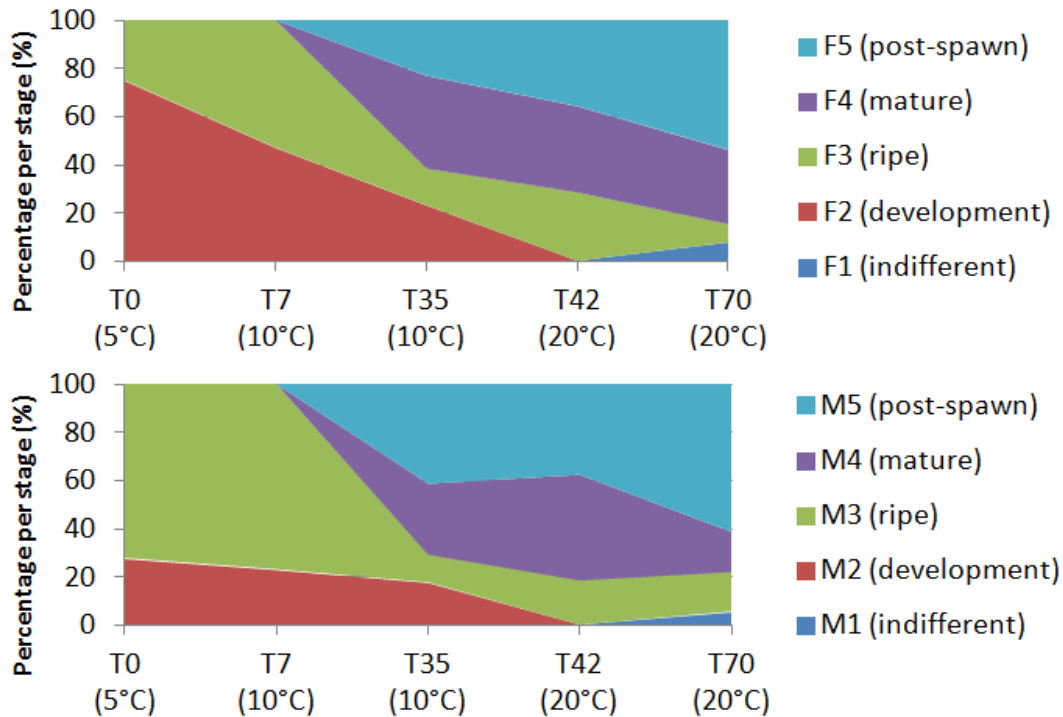


Figure 7.5 Maturation stage (%) of *Mytilus edulis* for female and male during the experiment following an increase of temperatures. (n = 30/sacrifice)

7.1.5 Discussion and Conclusion

During ecotoxicological field study, the immunomodulation analysis remains a complex issue because of the confounding factors such as temperature, salinity, etc... All these factors can influence the capacity of an organism to deal with a pathogen, a xenobiotic's mixture or combined stress (Gagné *et al.*, 2008). With this research, we wanted to understand how *M. edulis* can react and adapt its immune system to a range of temperatures and following by an exposure to CdCl₂ in a stress to stress study. This type of study was conducted on bivalves, with various experimental designs, but not for *M. edulis* on a long-term experiment in controlled conditions. Indeed, it is already well established that temperature can affect bivalve growth (Seed *et al.*, 1976; Lemaire *et al.*, 2006) and it is in direct relation with the food availability and reproduction cycle (Seed *et al.*, 1976; Maug myint et Tyler, 1982; Thompson, 1984; Lemaire *et al.*, 2006). This relationship with the spawning period was clearly observed during our experiment and can be observed by the important decreased in the GSI (see Figure 1). Indeed, after being maintained for 28 days at 10°C without food, the mussels initiate their

spawning and pursue it until the end. Moreover, it has been shown that digestive gland weight (DGI) (energy reserved organ) can change in stressful condition and during high metabolic demand such as gametogenesis (Thompson, 1984; Cartier *et al.*, 2004). We can see in our results a significant decrease of the DGI seven days after spawn beginning, which also concord with the first sacrifice at 20°C. The histological analysis allowed us to confirm the clear progression of the maturity index of both sexes, which confirms the increase in energetic demand for gametogenesis. Despite the decrease in the DGI and GSI, the general condition (CI) of our blue mussels did not change.

The variation of temperature can also affect the bivalve immunity in different ways according to the species. Indeed, Matozzo *et al.* (2012) have shown that this confounding factor can modify the hemocyte count and the lysozyme activity on *C. gallina* and *M. galloprovincialis*. However, Li *et al.* (2008) did not observe this effect on lysozyme after a thermal choc at 5°C and 30°C. Moreover, it had been noticed that high temperature can decrease the time of hemocytes spreading in *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997), the number of viable hemocytes in *C. gigas* (Gagnaire *et al.*, 2006) and the ability of *C. gallina* hemocytes to phagocyte yeast particles (Monari *et al.*, 2007; Mosca *et al.*, 2013). All these variations in bivalve's species showed the importance of understanding also how *M. edulis* immunity can vary at different temperatures. For *M. edulis*, our results showed that the hemocyte viability is lower at 5°C with and without CdCl₂ exposure. This reduced viability value may be due to an adaptation to cold temperatures to avoid consuming too much energy (reduced Standard Metabolic Rate) (Sokolova et Lannig, 2008). Despite this result, the phagocytic capacity and efficacy of the hemocytes is clearly higher, especially when exposed to CdCl₂ (see Figures 2 and 3). In addition, the risk of infection is less important in cold water given that the clearance rate of mussels is higher than the pathogen proliferation (Hernroth, 2003). Moreover, Fisher and Tamplin (1988) showed that temperature also influence the hemocyte locomotion. However, the mussel hemocytes are still ready to be challenged as shown in our results following the CdCl₂ exposure (See Figure 3). After reaching 10°C (T7), the hemocytes viability increased by 7% and became superior by almost 20% after 28 days (T35) compared to T0. On the other hand, the phagocytosis activity decreased to his lowest level (T7 and T35), but

when exposed to CdCl₂ the hemocytes from the acclimated mussels at 10°C (T35) have better engulfment of beads than after increasing the temperature (see Figures 2 and 3). The mussels still seem to have the ability to adapt their immunity by modulating upward the number of viable hemocytes (results not shown), despite a reduction of phagocytosis.

After T35, temperature was increased to reach 20°C (T42) and there was a variation in *M. edulis* immunity. However, the spawning effect on immunity needs to be considered. Indeed, Lemaire *et al.* (2006) have noticed a significant diminution of the phagocytosis during the spawning period which was also confirmed by Fraser *et al.* (2013). However, we did not observe this decrease of phagocytosis after the beginning of the spawn but a significant increase (T42) compared to the previous sacrifice (T35). This divergence in our results in Figure 2 may possibly be explained by: 1) an increase in bacterial proliferation in the mesocosm which challenged the mussel's hemocytes which have reacted with a stronger phagocytic response or 2) a recovery of the phagocytic ability like demonstrate on the Pacific oyster (Li *et al.*, 2008) and mentioned by Fraser *et al.* (2013) for *M. edulis*. Indeed after 28 days at 20°C (T70), with a continuous spawning since T35, the phagocytic activities probably begin to decline due to the mussels filtering the water in the mesocosm to be almost cleared of gametes and bacteria's and decreased the pressure on the immune system (see Figure 2). We also observed the same pattern following the cadmium exposure (see Figure 3). On the other side, the lysozyme activity is very stable throughout the experiment despite the temperature variations. Similar results were obtained by Li *et al* (2008) for *Mytilus galloprovincialis*, and Nilsen *et al.* (1999) for *Chlamys islandica* who observed that this enzyme was active in cold temperatures and kept a stable activity when heated (Mydlarz *et al.*, 2006). On the other side, the modulation of cyclooxygenase activity observed in the Figure 4B may be caused by the spawning process. In fact, the COX activity increased non significantly after four weeks at 10°C (T35) when this process begin. Then, a significant higher level was reached at T70 after a month at 20°C during the principal spawning moment. This result can also be observed with the variation of GSI (Figure 1) and by progression of the maturity index (Figure 5). In fact, an increase in the COX activity to assist the spawning process has already been observed and confirmed in

other experiment (Gagné *et al.*, 2007). The evaluation of the maturity index (Figure 5) allows us to observe a clear progression in the gamete development of mussels and the percentage of them who have already spawn. All immunological parameters were analysed by gender, but no significant differences between males and females were observed (results not shown).

With this experiment, we have demonstrated that *M. edulis* can adjust its cellular immunity by modulating their number of viable hemocytes, their viability and their phagocytic capacity and efficacy. However, we observed that mussels kept at 5°C have a better ability to face a stress on stress challenge such as cadmium exposure. We have also shown that the lysozyme activity stays stable at all temperatures. Moreover, we have confirmed that the spawning is influenced by water temperature and assisted by an increase of COX activity in *M. edulis*. Finally, all analysis was performed between sexes and no significant differences were found. This study also consolidates the importance of evaluating the impact of confounding factors in field studies.

8 REFERENCES

- Aasen JA, Hardstaff W, Aune T & Quilliam MA (2006) Discovery of fatty acid ester metabolites of spirolide toxins in mussels from Norway using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20: 1531-1537.
- Alix G, Beaudry A, Brousseau-Fournier C, Fortier M, Auffret M, Fournier M & Brousseau P (2013) Increase sensitivity to metals of hemocytes obtained from *Mya arenaria* collected at different distances from the shore. *J Xenobiotics* 3(1s): 29-30.
- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J & Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76: 160-202.
- Adema CM, Van der Knapp WPW & Sminia T (1991) Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: The role of reactive oxygen intermediates. *Rev Aquat Sci* 4: 201-223.
- Anderson DP, Paynter KT & Bureson EM (1992) Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdraw from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Biol Bull* 183: 476-481.
- Anderson RS (1993) Modulation of nonspecific immunity by environmental stressors. *Advances in Fisheries Science, Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms*, Couch JA & Fournie JW (Édit.) CRC Press, London. p 483-510.
- Andral B, Stanisière JY, Sauzade D, Damier E, Thebault H, Galgani F & Boissery P (2004) Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar Pollut Bull* 49: 704-712.
- Auffret M (2005) Bivalves as models for marine immunotoxicology. *Investigative immunotoxicology*. Tryphonas H, Fournier M, Blakley BR, Smits JEG & Brousseau P (Édit.) Taylor and Francis, New York. p 29-48.
- Bakhmet IN, Berger VJ & Khalaman VV (2005) The effect of salinity change on the heart rate of *Mytilus edulis* specimens from different ecological zones. *J Exp Mar Biol Ecol* 318: 121-126.
- Barbault R & Blandin P (1980) La notion de stratégie adaptative: sur quelques aspects énergétiques, démographiques et synécologiques. *Problèmes d'écologie théorique : les stratégies adaptatives*. Barbault R, Blandin P & Meyer JA (Édit) Maloine, Paris. p 1-27.

- Barbault R (1981) *Ecologie des populations et des peuplements: des théories aux faits*. Masson, Paris.
- Baumard P, Budinski H, Garrigues P, Dizer H & Hansen PD (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and season variations. *Mar Environ Res* 47: 14-47.
- Beaudry A, Brousseau-Fournier C, Alix G, Fortier M, Auffret M, Brousseau P & Fournier M (2013) Influence of Tidal Stress on the Immunocompetence of Hemocytes in Soft-Shell Clam (*Mya arenaria*). *J Xenobiotics* 3(1s): 34-35.
- Beaudry A, Lacaze E, Jobin-Piché A, Masson S, Auffret M, Brousseau P & Fournier M (2015) Ecotoxicological evaluation of the immunocompetence of two bivalves species (*Mya arenaria* and *Mytilus edulis*) in the Saguenay Fjord including a salinity gradient. *J Xenobiotics* 5(2): 27-30.
- Bibby R, Widdicombe S, Parry H, Spicer J & Pipe R (2008) Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat Biol* 2: 67-74.
- Blaise C, Gagné F, Pellerin J, Hansen PD & Trottier S (2002) Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay fjord with the softshell clam *Mya arenaria*. *Environ Toxicol* 17: 170-186.
- Braby CE & Somero GN (2006) Following the heart: temperature and salinity effects on heart rate in native and invasive species of blue mussels (genus *Mytilus*). *J Exp Biol* 209: 2554-2566.
- Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Cyr D, Blakley B, Boermans H & Fournier M (2000) Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. *Toxicology* 142: 145-156.
- Brousseau P, Pillet S, Frouin H, Auffret M, Gagné F & Fournier M (2012) Linking immunotoxicity and Ecotoxicological Effects at Higher Biological Levels. *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*, Amiard-Triquet C, Amiard JC & Rainbow PS (Édit.) CRC Press, Boca Raton. p 132-146.
- Bussell JA, Gidman EA, Causton DR, Gwynn-Jones D, Malham SK, Jones MLM, Reynolds B & Seed R (2008) Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress. *J Exp Mar Biol Ecol* 358: 78-85.

- Cai WX, Lin Q, Li C & Gan M (2008) The application and development of the Mussel Watch system in China. *Bioinformatics Biochemical Engineering 2nd international conference*. p 4512-4518.
- Calow P (1973) The relationship between fecundity, phenology and longevity: a system approach. *Am Nat* 107: 559-564.
- Calow P (1978) The evolution of life-cycle strategies in fresh water gastropods. *Malacologia* 12: 351-364.
- Canesi L, Gallo G, Gavioli M & Pruzzo C (2002) Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc Res Tech* 57: 469-476.
- Canesi L, Betti M, Ciacci C, Clitterio B, Pruzzo C & Gallo G (2003) Tyrosine kinase-mediated cell signalling in the activation of *Mytilus* hemocytes: possible role of STAT-like proteins. *Biol Cell* 95: 603-613.
- Carballal MJ, Lopez C, Azevedo C & Villalba A (1997) In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 7: 403-416.
- Cartier S, Pellerin J, Fournier M, Tamigneaux E, Girault L & Lemaire N (2004) Use of an index based on the mussel (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) digestive gland weight to assess the nutritional quality of mussel farm sites. *Aquaculture* 241: 633-654.
- Casas S, Cossa D, Gonzalez JL, Bacher C & Andral B (2004) Modelling trace metal accumulation in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Rap Comm int Mer Médit* 37: 306-308.
- Caussy D, Gochfeld M, Gurzau E, Neagu C & Ruedel H (2003) Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk. *Ecotox Environ Safe* 56: 45-51.
- Cheng TC (1977) Biochemical and ultrastructural evidence for the double role of phagocytosis in molluscs: defense and nutrition. *Comparative Pathobiol* 3: 21-30.
- Cheng TC (1998b) In vivo effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: phagocytic and endocytic indices. *J Invertebr Pathol* 51: 215-220.
- Cherkasov AS, Grewal S & Sokolova IM (2007) Combined effects of temperature and cadmium exposure on haemocyte apoptosis and cadmium accumulation in the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J Therm Biol* 32: 162-170.

- Ciacci C, Barmo C, Fabbri R, Canonico B, Gallo G & Canesi L (2011) Immunomodulation in *Mytilus galloprovincialis* by non-toxic doses of hexavalent Chromium. *Fish Shellfish Immunol* 31: 1026-1033.
- Clausen I & Riisgard HU (1996) Growth, filtration and respiration in the mussel *Mytilus edulis*: no evidence for physiological regulation of the filter-pump to nutritional needs. *Mar Ecol- Prog Ser* 141: 37-45.
- Coles JA, Fairly SR & Pipe RK (1994) The effects of fluoranthene on the immuno-competence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *J Aquat Toxicol* 30: 367-379.
- Cooper JE & Knowler C (1992) Investigations into causes of death of endangered molluscs (*Partula* species). *Vet Rec* 131(15): 342-344.
- Davies IM & Pirie JM (1980) Evaluation of mussel watch project for heavy metals in Scottish coastal waters. *Mar Biol* 57(2): 87-93.
- de Montaudouin X, Paul-Pont I, Lambert C, Gonzalez P, Raymond N, Jude F, Legeay A, Baudrimont M, Dang C, Le Grand F, Le Goïc N, Bourasseau L & Paillard C (2010) Bivalve population health: Multistress to identify hot spots. *Mar Pollut Bull* 60: 1307-1318.
- Dionne S (2001) Plan de conservation des écosystèmes du Parc marin du Saguenay–Saint-Laurent. Parc Marin du Saguenay-Saint-Laurent, Parcs Canada.
- Duchemin MB, Auffret M, Wessel N, Fortier M, Morin Y, Pellerin J & Fournier M (2008) Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through in vivo, in tubo and in vitro exposures. *Environ Pollut* 153: 416-423.
- e Silva CAR, Smith BD & Rainbow PS (2006) Comparative biomarkers of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil). *Mar Environ Res* 61: 439-455.
- Fernandez B, Campillo JA, Martinez-Gomez C & Benedicto J (2010a) Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. *Aquat Toxicol* 99(2): 186-197.
- Fisher WS (1988) Environmental influence on bivalve haemocyte function. *Am Fish Soc Spec Publ* 18: 225-237.

- Fisher WS & Tamplin M (1988) Environmental influence on activities and foreign-particles binding by hemocytes of american oysters, *Crassostrea virginica*. *Can J Fish Aquat Sci* 45: 1309-1315.
- Fisher WS, Oliver LM, Walker WW, Manning CS & Lytle TF (1999) Decreased resistance of eastern oysters (*Crassostrea virginica*) to a protozoan pathogen (*Perkinsus marinus*) after sublethal exposure to tributyltin oxide. *Mar Environ Res* 47: 185-201.
- Fournier M, Cyr D, Blakley B, Boermans H & Brousseau P (2000) Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *Americ Zoologist* 40: 412-420.
- Fournier M, Pellerin J, Clermont Y, Morin Y & Brousseau P (2001) Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161: 201-211.
- Fournier M, Pellerin J, Lebeuf M, Brousseau P, Morin Y & Cyr D (2002) Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquat toxicol* 59: 83-92.
- Fournier M, Blakley B, Boermans H & Brousseau P (2005) Toxicological considerations - making the connection between toxicologic and immunotoxicologic studies as these relate to human and ecosystem health. Investigative Immunotoxicology, Tryphonas H, Fournier M, Blakley BR, Smits JEG & Brousseau P (Édit) CRC Press, Boca Raton. p 385-406.
- Fraser M, Rault P, Roumier PH, Fortier M, André C, Brousseau P, Gagné F, Fournier F, Surette C & Vaillancourt C (2013) Decrease in phagocytosis capacity of hemocyte during spawning in *Mytilus edulis*: a pilot study. *J Xenobiotics* 3(s1): 31-33.
- Fujimoto Y, Sakuma S, Inoue T, Uno E & Fujita T (2002) The endocrine disruptor nonylphenol preferentially blocks cyclooxygenase-1. *Life Sci* 70: 2209-2214.
- Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, Thomas-Guyon H & Renault T (2006) Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol* 20: 536-547.
- Gagné F, Blaise C, Pellerin J, Pelletier E & Strand J (2006) Health status of *Mya arenaria* bivalves collected from contaminated sites in Canada (Saguenay Fjord) and Denmark (Odense Fjord) during their reproductive period. *Ecotox Environ Safe* 64: 348-361.

- Gagné F, Blaise C, Pellerin J & André C (2007) Neuroendocrine disruption in *Mya arenaria* clams during gametogenesis at sites under pollution stress. *Mar Environ Res* 64(2): 87-107.
- Gagné F, Blaise C, Pellerin J, Fournier M, Durand MJ & Talbot A (2008) Relationship between intertidal clam population and health status of soft-shell clam *Mya arenaria* in the St. Lawrence Estuary and Saguenay Fjord (Québec, Canada). *Environ Int* 34: 30-43.
- Gagné F, Blaise C, Pellerin J, Fournier M, Gagnon C, Sherry J & Talbot A (2009) Impacts of pollution in feral *Mya arenaria* populations: The effects of clam bed distance from the shore. *Sci Total Environ* 407: 5844-5854.
- Gagné F, Douville M, Fortier M & Fournier M (2015) Effects of a municipal effluent on freshwater mussel *Elliptio complanata* following challenge with *Vibrio anguillarum*. *J Environ Sci* 37: 91-99.
- Galloway TS & Depledge MH (2001) Immunotoxicity in invertebrates: Measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 10: 5-23.
- Galloway TS & Goven AJ (2006) Invertebrate immunotoxicology. Immunotoxicology and Immunopharmacology, Luebke R, House RV & Kimber I (Édit) CRC Press, Boca Raton. p 365-384.
- Gardner JPA & Thompson RJ (2001) The effects of coastal and estuarine conditions on the physiology and survivorship of the mussels *Mytilus edulis*, *M. trossulus* and their hybrids. *J Exp Mar Biol Ecol* 265: 119-140.
- Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Blaise C & Gagné F (2002) Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors? *Comp Biochem Physiol* 131c: 457-467.
- Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Fournier M & Amiard JC (2006) Immunological and biochemical responses in *Mya arenaria* (Mollusca: Bivalvia) exposed in vivo to estradiol-17 β . *Comp Biochem Physiol* 144C: 228-234.
- 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(1): 133-156.

- Gillis PI, Gagné F, Mcinnis R, Hooey TM, Choy ES, André C, Hoque MDE & Metcalfex CD (2014) The impact of municipal wastewater effluent on field-deployed freshwater mussels in the grand river (Ontario, Canada). *Environ Toxicol Chem* 33(1): 134-143.
- Gobeil C, Rondeau B & Beaudin L (2005) Contribution of municipal effluents to metal fluxes in the St. Lawrence River. *Environ Sci Technol* 39: 456-464.
- Goldberg ED (1975) The Mussel Watch: a first step in global monitoring. *Mar Pollut Bull* 6: 111.
- Goldberg ED (1986) The mussel watch concept. *Environ Monitor Assess* 7: 91-103.
- Gossiaux DC, Landrum PF & Fisher S (1998) The assimilation of contaminants from suspended sediment and algae by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere* 36: 3181-3187.
- Greco L, Pellerin J, Capri E, Garnerot F, Louis S, Fournier M, Sacchi A, Fusi M, Lapointe D & Couture P (2011) Physiological effects of temperature and a herbicide mixture on the soft-shell clam *Mya arenaria* (Mollusca, Bivalvia). *Environ Toxicol Chem* 30(1): 132-141.
- Gueguen Y, Cadoret JP, Flament D, Barreau-Roumiguère C, Girardot AL, Garnier J, Hoareau A, Bachère E & Escoubas JM (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303: 139-145.
- Guolan H & Yong W (1994) Effects of tributyltin chloride on marine bivalve mussels. *Water Res* 29: 1877-1884.
- Gust M, Gélinas M, Fortier M, Fournier M & Gagné F (2012) In vitro immunotoxicity of environmentally representative antibiotics to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Environ Pollut* 169: 50-58.
- Hannam ML, Bamber SD, Sundt RC & Galloway TS (2009) Immune modulation in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to North Sea produced water. *Environ Pollut* 157: 1939-1944.
- Hanson JM, Mackay WC & Prepas EE (1988) The effect of water depth and density on the growth of a unionid clam. *Freshwater Biol* 19: 345-355.
- Hernroth B (2003) The influence of temperature and dose on antibacterial peptide response against lipopolysaccharide in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol* 14: 25-37.

- Hubbell SP (1971) Of sowbugs and systems: the ecological energetics of a terrestrial isopod. *Systems analysis and simulation in ecology*, Patten BC (Édit) Academic Press, New York. p 269-323.
- Hylland K (2006) Biological effects in the management of chemicals in the marine environment. *Mar Pollut Bull* 53(10-12): 614-619.
- Hylland K, Tollefsen KE, Ruus A, Jonsson G, Sundt RC, Sanni S, Utvik TIR, Johnsen S, Nilssen I, Pinturier L, Balk L, Barsiene J, Marigomez I, Feist SW & Borseth JF (2008) Water Column monitoring near oil installations in the North SEA 2001-2004. *Mar Pollut Bull* 56: 414-429.
- IPCC (2007) *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB & Miller HL (Édit) Cambridge University Press, Cambridge et New York. 996 p.
- Lam PKS & Gray JS (2003) The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar Pollut Bull* 46: 182-186.
- Lebeuf M & Nunes T (2005) PCBs and OCPs in sediment cores from the lower St. Lawrence Estuary, Canada: evidence of fluvial inputs and time lag in delivery to coring sites. *Environ Sci Technol* 39: 1470-1478.
- Lee YC & Yang D (2002) Determination of lysosome activities in a microplate format. *Analyt Biochem* 310: 223-224.
- Lemaire N, Pellerin J, Fournier M, Girault L, Tamigneaux E, Cartier S & Pelletier E (2006) Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *Mytilus* spp. from farm sites of eastern Quebec. *Aquaculture* 261: 729-751.
- Lemaire N & Pelletier E (2013) Chemical and Microbial Contamination Baseline in the Saguenay–St. Lawrence Marine Park (Eastern Canada): Concentrations and Fluxes From Land-Based Sources. *Arch Environ Contam Toxicol* 65: 421-433.
- Lemaitre B & Hoffmann J (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 25: 697-743.
- Lesser MP, Bailey MA, Merselis DG & Morrison JR (2010) Physiological response of the blue mussel *Mytilus edulis* to differences in food and temperature in the Gulf of Maine. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 156(4): 541-551.

- Levine RH (1999) Model of PAH and PCB bioaccumulation in *Mya arenaria* and application for site assessment in conjunction with sediment quality screening criteria. MIT library.
- Li H, Parisi MG, Toubiana M, Cammarata M & Roch P (2008) Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. *Fish Shellfish Immunol* 25: 143-152.
- Luengen AC, Friedman CS, Raimondi PT & Flegal AR (2004) Evaluation of mussel immune responses as indicators of contamination in San Francisco Bay. *Mar Environ Res* 57: 197-212.
- Luna-Gonzalez A, Romero-Geraldo MDJ, Campa-Cordova A, Orduna-Rojas J, Valles-Jimenez R & Ruiz-Verdugo C (2008) Seasonal variations in the immunological and physiological parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in Bahia de Macapule (Sinaloa, Mexico). *Aquac Res* 39: 1488-1497.
- Malagoli D, Casarini L, Sacchi S & Ottaviani E (2007) Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish Shellfish Immun* 23: 171-177.
- Matozzo V & Marin MG (2011) Bivalve immune responses and climate changes: is there a relationship? *ISJ* 8: 70-77.
- Matozzo V, Chinellato A, Munari M, Finos L, Bressan M & Marin MG (2012) First evidence of immunomodulation in bivalves under seawater acidification and increased temperature. *Plos One* 7: 1-14.
- Maug myint U & Tyler PA (1982) Effects of temperature, nutritive and metal stressors on the reproductive biology of *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 67: 209-223.
- McGeer J, Henningsen G, Lanno R, Fisher N, Sappington K & Drexler J (2004) Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals. U.S. Environmental Protection Agency Risk Assessment Forum, Washington. 122 p.
- Monari M, Matozzo V, Foschi J, Cattani O, Serrazanetti GP & Marin MG (2007) Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish Shellfish Immunol* 22: 98-114.
- Monirith I, Ueno D, Takahashi S, Nakata H, Sudaryano A, Subramanian A, Karrupiah S & Tanabe S (2003) Asia-Pacific mussel watch: monitoring contamination of persistent

- organochlorine compounds in coastal waters of Asian countries. *Mar Pollut Bull* 46: 281-300.
- Moore MN, Allen JI & McVeigh A (2006) Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Mar Environ Res* 61(3): 278-304.
- Morris TJ & Corkum LD (1999) Unionid growth patterns in rivers of differing riparian vegetation. *Freshwater Biol* 42: 59-68.
- Mosca F, Narcisi V, Calzetta A, Gioia L, Finioia MG, Latini M & Tiscar PG (2013) Effects of high temperature and exposure to air on mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lmk 1819) hemocyte phagocytosis: modulation of spreading and oxidative response. *Tissue cell* 45: 198-203.
- Mydlarz LD, Jones LE & Harvell CD (2006) Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. *Annu Rev Ecol Syst* 37: 251-288.
- Navarro JM (1988) The effects of salinity on the physiological ecology of *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) (*Bivalvia: Mytilidae*). *J Exp Mar Biol Ecol* 122: 19-33.
- Newell RC & Hidu H (1982) The effects of sediment type on growth rate and shell allometry in the soft shelled clam *Mya arenaria* L. *J Exp Mar Biol Ecol* 65: 285-295.
- Nilsen IW, Overbo K, Sandsdalen E, Sandaker E, Sletten K & Myrnes B (1999) Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity. *FEBS Lett* 464: 153-158.
- Oliver LM & Fisher WS (1999) Appraisal of prospective bivalve immunomarkers. *Biomarkers* 4: 510-530.
- Oubella R, Maes P, Paillard C & Auffret M (1993) Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (*Mollusca, Bivalvia*). *Dis Aquat Org* 15: 193-197.
- Parry HE & Pipe RK (2004) Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat Tox* 69: 311-325.
- Peachy RBJ (2003) Tributyltin and polycyclic aromatic hydrocarbon levels in Mobile Bay, Alabama: a review. *Mar Pollut Bull* 46: 1365-1371.

- Pellerin J & Amiard JC (2009) Comparison of bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in two marine bivalves (*Mytilus edulis* and *Mya arenaria*). *Comp Biochem Phys C Toxicol Pharmacol* 150: 186-195.
- Pellerin J, Fournier M, Gauthier-Clerc S, Blaise C, Garnerot F, Amiard JC & Gagné F (2009) Qu'en est-il de l'état de santé des myes au Saguenay? Un bilan d'études sur plus d'une décennie. *Rev Sci Eau* 22 : 271-289.
- Pelletier E, Desbiens I, Sargian P, Côté N, Curtosi A & St-Louis R (2009) Présence des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les compartiments biotiques et abiotiques de la rivière et du fjord du Saguenay. *Rev Sci Eau* 22 (2) : 235-251.
- Perceval O, Couillard Y, Penil-Alloul B, Giguère A & Campbell PGC (2004) Metal-induced stress in bivalves living along a gradient of Cd contamination: relating sub-cellular metal distribution to population-level responses. *Aquat Toxicol* 69: 327–345.
- Pereira P, Dias E, Franca S, Pereira E, Carolino M & Vasconcelos V (2004) Accumulation and depuration of cyanobacterial paralytic shellfish toxins by the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Aquat Toxicol* 68: 339-350.
- Perez DG & Fontanetti CS (2010) Hemocytical responses to environmental stress in invertebrates: a review. *Environ Monit Assess* 177: 437-447.
- Pieters H, Kluytmans JH, Zandee DI & Cadée GC (1980) Tissue composition and reproduction of *Mytilus edulis* in relation to food availability. *Neth J Sea Res* 14: 349-361.
- Pipe RK & Coles JA (1995) Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immun* 5: 581-595.
- Raftopoulou EK & Dimitriadis VK (2010) Assessment of the health status of mussels *Mytilus galloprovincialis* along Thermaikos Gulf (Northern Greece): An integrative biomarker approach using ecosystem health indices. *Ecotox Environ Safe* 73: 1580-1587.
- Ramu K, Kajiwarra N, Sudaryanto A, Isobe T, Takahashi S, Subramanian A, Ueno D, Zheng GJ, Lam PKS, Takada H, Pauzi P, Zakaria M, Viet PH, Prudente MR, Tana TS & Tanabe S (2007) Asian mussel watch program: contamination status of polybrominated diphenylethers and organochlorines in coastal waters of Asian countries. *Environ Sci Technol* 41: 4580-4586.

- Renwranz L (1990) Internal defence system of *Mytilus edulis*. Studies in Neuroscience, Neurobiology of *Mytilus edulis*, Stefano GB (Édit) Manchester University Press, Manchester. p 256–275.
- Roseberry L, Vincent B & Lemaire C (1991) Croissance et reproduction de *Mya arenaria* dans la zone intertidale de l'estuaire du Saint-Laurent. *Can J Zool* 69: 724-732.
- Rowley AF, Vogan CL, Taylor GW & Clare AS (2005) Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *J Exp Biol* 208: 3-14.
- Ruiz Y, Suarez P, Alonso A, Longo E, Villaverde A & San Juan F (2011) Environmental quality of mussel farms in Vigo estuary: Pollution by PAHs, origin and effects on reproduction. *Environ Pollut* 159: 250-265.
- Salo H, Dautremepuits C, Smits J, Brousseau P & Fournier M (2005) Immune markers in ecotoxicology: a comparison across species. Investigative Immunotoxicology, Tryphonas H, Fournier M, Blakley BR, Smits JEG & Brousseau P (Édit) CRC Press, Boca Raton. p 147-162.
- Sauvé S, Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Sénécal L, Goudreau P & Fournier M (2002) Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquat Tox* 58: 189-200.
- Seed R (1976) Ecology. Marine Mussels: Their Ecology and Physiology, Bayne BL (Édit) Cambridge University Press, New York. p 13-66.
- Sheir SK & Handy RD (2010) Tissue Injury and Cellular Immune Responses to Cadmium Chloride Exposure in the Common Mussel *Mytilus edulis*: Modulation by Lipopolysaccharide. *Arch Environ Contam Toxicol* 59: 602-613.
- Sokolova IM, Evans S & Hughes FM (2004) Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *J Exp Biol* 207: 3369-3380.
- Sokolova IM & Lannig G (2008) Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim Res* 37: 181-201.
- Song L, Lingling W, Limei Q & Zhang H (2010) Bivalve Immunity. Invertebrate Immunity, Söderhäll K (Édit.) Springer Science+Business Media, LLC, New York. p 44-65.

- Stickle WB & Sabourin TD (1979) Effects of salinity on the respiration and heart rate of the common mussel, *Mytilus edulis* L., and the black chiton, *Katherina tunicata* (Wood). *J Exp Mar Biol Ecol* 41: 257-268.
- Szefer P, Fowler SW, Ikuta K, Paez Osuna F, Ali AA, Kim BS, Fernandes HM, Belzunce MJ, Guterstam B, Kunzendorf H, Wolowicz M, Hummel H & Deslou-Paoli M (2006) A comparative assessment of heavy metal accumulation in soft parts and byssus of mussels from subarctic, temperate, subtropical and tropical marine environments. *Environ Pollut* 139: 70-78.
- Takahashi KG & Muroga K (2008) Cellular Defense Mechanisms in Bivalve Molluscs. *Fish Pathol* 43: 1-17.
- Tanguy A, Bierne N, Saavedra C, Pina B, Bachère E, Kube M, Bazin E, Bonhomme F, Boudry P, Boulo V, Boutet I, Cancela L, Dossat C, Favrel P, Huvet A, Jarque S, Jollivet D, Klages S, Lapègue S, Leite R, Moal J, Moraga D, Reinhardt R, Samain JF, Zouros E & Canario A (2008) Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species : development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. *Gene* 408: 27-36.
- Tanguy M, McKenna P, Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Danger JM & Siah M (2013) Sequence analysis of a normalized cDNA library of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* LGP32 strain. *Results Immunol* 3: 40-50.
- Thompson RJ (1984) The reproductive cycle and physiological ecology of the mussel *Mytilus edulis* in a subarctic, non-estuarine environment. *Mar Biol* 79: 277-288.
- Tremblay R & Pellerin-Massicotte J (1997) Effect of the tidal cycle on lysosomal membrane stability in the digestive gland of *Mya arenaria* and *Mytilus* L. *Comp Biochem Physiol* 117A: 99-104.
- van der Oost R, Beyer J & Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149.
- Vasseur P & Cossu-Leguile C (2006) Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. *Chemosphere* 62: 1033-1042.
- Viglino L, Pelletier E & Lee L (2006) Butyltin species in benthic and pelagic organisms of the Saguenay Fjord (Canada) and imposex occurrence in common whelk (*Buccinum undatum*). *Arch Environ Contam Toxicol* 50: 45-59.

- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM & Peakall DB (2001) Principles of ecotoxicology. Taylor and Francis, London. 211 p.
- Westerbom M, Kilpi M & Mustonen O (2002) Blue mussels, *Mytilus edulis*, at the edge of the range: population structure, growth and biomass along a salinity gradient in the north-eastern Baltic Sea. *Mar Biol* 40: 991-999.
- White PA, Blaise C & Rasmussen JB (1997) Detection of genotoxic substances in bivalve molluscs from the Saguenay Fjord (Canada), using the SOS chromotest. *Mutat Res* 392: 277-300.
- Whitehead A, Anderson SL, Kuivila KM, Roach JL & May B (2003) Genetic variation among interconnected populations of *Catostomus occidentalis*: implications for distinguishing impacts of contaminants from biogeographical structuring. *Mol Ecol* 12: 2817-2833.
- Widdows J & Page DS (1993) Effects of tributyltin and dibutyltin on the physiological energetics of the mussel, *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res* 35: 233-249.
- Wildish DJ & Miyares MP (1990) Filtration rate of blue mussels as a function of flow velocity: preliminary experiments. *J Exp Mar Biol Ecol* 142: 213-219.
- Witorsch RJ (2002) Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted? *Regul Toxicol Pharmacol* 36(1): 118-130.
- Wootton EC, Dyrinda EA & Ratcliffe NA (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.
- Zangrandi M, Catsiki VA & Avdis OLV (2005) The sensitivity of mussel-watch programmes to detect temporal trends in the bio-availability of metals. A case study of the Saronicos Gulf of Greece. *J Environ Monitor* 7: 798-803.
- Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J & Jiang G (2008) Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta* 606: 135-150.
- Zorita I, Ortiz-Zarragoita M, Apraiz I, Cancio I, Orbea A, Soto M, Marigomez I & Cajaraville P (2008) Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using mussels as sentinel organisms. *Environ Pollut* 153(1): 157-168.