

INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

**DÉVELOPPEMENT DE BIOMARQUEURS POUR LES ÉTUDES COMPARATIVES DES
MOULES DE KERGUELEN FACE AUX ACTIVITÉS ANTHROPIQUES**

Par

France Caza, MD

Thèse présentée pour obtenir le grade de

Philosophiae doctor (Ph.D)

en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Jacques Bernier Ph.D.
INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe

Sophie Breton Ph.D.
Université de Montréal

Examineur externe

Philippe Archambault
Université Laval

Directeur de recherche

Richard Villemur Ph.D.
INRS-Institut Armand Frappier

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont d'abord à mon directeur de recherche Richard Villemur particulièrement pour ses conseils judicieux et son sens de la critique scientifique. Ce projet a vu le jour grâce aux instigateurs du projet IPOC avec le projet Immunotoxiker grâce à Michel Fournier et Michel Auffret financés par l'Agence Nationale de la Recherche et le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada. Merci aux professeurs Edouard Potworowski et Rolf Morosoli pour leur appui tout au long de cette aventure. Je remercie tous nos collaborateurs et les instituts de recherche ayant permis la réalisation des campagnes de Kerguelen, avec une merci spécial à Nina Marchand, Romuald Bellec, Yann Lemeur de l'Institut Polaire Français Paul-Émile Victor (IPEV), ainsi qu'Adrien, Jean-Baptiste, et Julien de la Réserve Naturelle de France, et tous les accompagnateurs de « manips » sur le terrain, dont Vincent Terol, Jean-François Laclavetine, Didier Boutenet, Adrien, Marc Leblanc, Christiane Geoffroy et tout le personnel de soutien de la base de Kerguelen. Au laboratoire de l'INRS Institut Armand-Frappier, le soutien de Marlène Fortier à distance (Kerguelen) ou pour son expertise et collaboration en laboratoire m'ont été précieux. Merci aux collaborateurs Maximiliano Cledon, Ève Bernet et Frédéric Veyrier. J'ai pu compter sur le support de mes collègues de laboratoire Nathalie Biebens-Laulan, Philippine Granger Joly de Boissel et Sophia Ferchiou pour m'aider à répondre à mes nombreuses questions. Je remercie ma famille, mes enfants et mes amis pour leur patience pour mes longs moments d'éloignement. Mes petits-enfants ont été une source d'inspiration autant par leur curiosité face à la nature des régions polaires que pour la quête d'un héritage amélioré de ces régions. Je remercie très particulièrement le professeur Stéphane Betoulle de l'université de Rheims qui m'a donné le goût d'étudier les moules dans un contexte immunotoxicologique. Il fait affectueusement parti du trio de « l'équipe des moules ». Il n'est pas seulement devenu un mentor mais un ami. Mes derniers remerciements vont au professeur Yves St-Pierre qui m'inspire au quotidien depuis plus d'une quarantaine d'années. Son influence m'a permis de relever des défis dont je ne soupçonnais pas la faisabilité. La monotonie ne faisant pas partie de son vocabulaire et partant du principe « sky is the limit », nous nous sommes promenés aux deux pôles de la planète à la recherche de solutions aux changements climatiques. Son sens de l'organisation et ses connaissances appuyées de nombreuses années de cogitation scientifique sont une mine inépuisable de ressourcement et d'inspiration. Merci pour tout.

LISTE DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Caza, France, Stéphane Betoulle, Michel Auffret, Pauline Brousseau, Michel Fournier, and Yves St-Pierre. 2015. "Comparative analysis of hemocyte properties from *Mytilus edulis desolationis* and *Aulacomya ater* in the Kerguelen Islands." *Marine Environmental Research* 110:174-182.

Caza, France, Maximilliano Cledon, and Yves St-Pierre, Y. 2016. Biomonitoring Climate Change and Pollution in Marine Ecosystems: A Review on *Aulacomya ater*. *Journal of Marine Biology*, 2016.

Caza, France, Stéphane Betoulle, Michel Auffret, Pauline Brousseau, Michel Fournier, and Yves St-Pierre. 2016. Comparative sequence analysis of Hsp70 gene from *Mytilus edulis desolationis* and *Aulacomya ater* of the Kerguelen Islands. *Journal of Xenobiotics* 6, no. 2.

Caza, France, Philippine Granger Joly de Boissel, Richard Villemur, Stéphane Betoulle, and Yves St-Pierre. 2019. Liquid biopsies for omics-based analysis in sentinel mussels." *PloS One* 14, no. 10.

Caza, France, Ève Bernet, Frédéric Veyrier, Stéphane Betoulle, and Yves St-Pierre. 2020. Hemocytes released in seawater act as Trojan horses for spreading of bacterial infections in mussels. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12

Boulinier, T., Betoulle, S., Caza, F., St-pierre, Y., Tornos, J., Boidin-Wichlacz, C., . . . Tasiemski, A. (2020). Panorama des recherches et des derniers résultats sur les pathogènes en milieu polaire. Rapport d'activité 2018-2019, IPEV, 60.

Soumis:

Bultelle, F., Boutet, I., Devinc, S., Caza, F., St-Pierre, Y., Pédena, R., Brousseau, P., Chanf, P., Vaudry, D., Le Folla, F., Fournier, M., Betoulle, S., , Auffret, M., and Rocher, B. 2020. Molecular response of the blue mussel (*Mytilus edulis platensis*) sub-Antarctic intertidal 2 invertebrate to a moderate thermal stress.

RÉSUMÉ

Les activités anthropiques affectent les écosystèmes marins, notamment à Kerguelen, un milieu subantarctique reconnu comme étant très sensible aux changements climatiques. L'étude des moules sentinelles présentes à Kerguelen, *Aulacomya atra* et *Mytilus edulis desolationis*, permet d'en évaluer l'impact en raison de leurs capacités de filtration et de bioaccumulation des polluants et métaux lourds. Les biomarqueurs conventionnels utilisés jusqu'à maintenant pour évaluer leur état de santé requièrent des prélèvements tissulaires sur place ou de l'individu entier. La logistique complexe de transport tenant compte de la chaîne de froid en région éloignée peut être compromise.

L'objectif général de la thèse visait à comparer leurs mécanismes d'adaptation des moules sentinelles de Kerguelen face à des stress anthropiques. Pour ce faire, j'ai utilisé deux approches, la première utilisant des biomarqueurs traditionnels, et la seconde une approche s'inspirant de l'utilisation des approches multi-omiques basée sur le concept de la biopsie liquide. L'étude des moules soumises à un stress thermique et à une exposition au cadmium a démontré que les réponses diffèrent entre les deux espèces. En soumettant les deux espèces à un stress thermique, nous avons également observé que leurs hémocytes quittent le compartiment vasculaire vers le compartiment intervalvaire pour ensuite être relâchés dans l'eau de mer. Ce relargage est plus marqué chez *A. atra*. Ces hémocytes immunocompétents peuvent survivre plusieurs heures dans l'eau de mer avant d'être recaptés par une autre moule, favorisant la dissémination d'agents infectieux. Ces résultats révèlent l'existence d'un nouveau mécanisme opportuniste pour disséminer l'infection chez son hôte en milieu marin en réponse à une élévation de température. Ceci pourrait expliquer la mortalité de masse rencontrée épisodiquement chez les bivalves au cours des dernières années en réponse aux changements climatiques.

En parallèle, nous avons développé une nouvelle génération de biomarqueurs chez la moule basée sur le concept de la biopsie et une logistique simple qui permet d'outrepasser le besoin de chaîne de froid. En utilisant les méthodes de qPCR et de ddPCR, nous avons mesuré et démontré que cette approche est aussi efficace pour conserver l'ADN que la congélation. Cette conclusion est supportée par nos résultats de séquençage à haut débit démontrant que les profils de microbiome retrouvés dans l'hémolymphe sont similaires entre les échantillons congelés

comparativement à ceux conservés sur carte de cellulose FTA qui protège et les acides nucléiques. Une étude comparative préliminaire du microbiote « circulant » entre les deux espèces de moules prélevées dans une même moulière a de plus démontré une différence de la composition et de la richesse du phylum. En dernier lieu, nous avons prouvé pour la première fois l'existence de fragments d'ADN libres circulant (ccfDNA) chez les deux moules en plus d'en définir les caractéristiques et de mettre en évidence la présence de ccfDNA d'origine du soi et du non-soi.

En conclusion, nos études nous ont permis de mieux comprendre la réponse hémocytaire des deux types de moule de Kerguelen face au stress environnementaux. Nous avons également mis au point une méthode de prélèvement (biopsie liquide et cartes FTA) logistiquement adaptée aux régions éloignées compatible aux nouvelles approches multi-omiques. L'ensemble du travail servira non seulement à mieux comprendre comment ces espèces sentinelles peuvent réagir face aux stress environnementaux mais aussi de favoriser la mise en place d'observatoires pour évaluer les effets à long terme des CC des écosystèmes marins en régions polaires.

Mots clés : Changements climatiques, *Aulacomya atra*, *Mytilus edulis desolationis*, cartes FTA, approches multi-omiques, ccfDNA, microbiome, stress thermique

ABSTRACT

Anthropogenic activities are well known to affect marine ecosystems, especially in Kerguelen, a subantarctic environment known to be very sensitive to climate change (CC). Such impact on marine ecosystems can be measured using sentinel mussels, *Aulacomya atra* and *Mytilus edulis desolationis*, two mussel species cohabiting in intertidal ecosystems of Kerguelen. The conventional biomarkers used to assess their health, however, requires logistically complex biobanking of tissue samples and killing of each individual, two major hurdles for studies in remote regions and new ethical considerations associated with the use of sentinel species for environmental monitoring.

The general objective of this thesis was to compare the mechanisms of adaptation of Kerguelen mussels to anthropogenic factors. For this purpose, I used two approaches, the first based on traditional biomarkers, and the second a new generation of hemolymphatic biomarkers inspired the recent progress accomplished in the field of liquid biopsy, a concept that is gaining ground in medicine. The first approach allowed us to show that both species responded differently to temperature stress and exposure to cadmium. While conducting these studies, we have also observed that their hemocytes leave the vascular compartment towards the interval space before being released in seawater. This release of hemocytes was more pronounced in the case of *A. atra*. Interestingly, we observed that hemocytes can survive for several hours in seawater while retaining their phagocytic functions before being recaptured by another mussel. By infecting the hemocytes with *Mycobacterium marinum*, we have followed the path of this recapture and the infection induced in recipient mussels and revealed the existence of a new opportunistic mechanism to disseminate infection. These findings may explain, at least in part, episodic mass mortality events in bivalves observed in recent years in response to CC.

During these studies, which were conducted in part during our research missions at Kerguelen, we have also developed a logistically-friendly sampling method based on the concept of liquid biopsy for mussels and well-suited for preservation of samples on cellulose FTA cards that protect DNA. Using the qPCR and ddPCR methods, we further showed that FTA cards were as efficient as frozen samples for DNA analysis. We have shown that this approach overcomes the need for a cold-chain and well-adapted for multi-omics approaches, most notably high throughput

sequencing methods. This approach allowed us to carry out preliminary studies of the comparative microbiota between the two species of mussels taken from the same mussel bed. Our findings showed a difference in the composition and richness of the bacterial phyla, indicating that microbiome of mussels depends on intrinsic factors. Finally, we revealed, for the first time, the existence of circulating cell free DNA (ccfDNA) in the hemolymph of mussels, defined its characteristics, and revealed the presence of ccfDNA from self and non-self origins including the possible existence of bacteria and viruses that we had not suspected the presence in Kerguelen.

In conclusion, our studies have enabled us to better understand the hemocyte response of Kerguelen's mussel populations to environmental stress. We have also developed a new sampling method logistically adapted to remote regions and compatible with highly sensitive multi-omic approaches. All the work will serve not only to better understand how these sentinel species can react to environmental stresses, but also to promote the establishment of observatories to assess long-term effects of CCs in marine ecosystems in polar regions.

Keywords: climate change, *Aulacomya atra*, *Mytilus edulis platensis*, FTA cards, multi-omic approach, ccfDNA, microbiome, heat stress

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
LISTE DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....	III
RÉSUMÉ	IV
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
CHAPITRE I: 1. LES CHANGEMENTS CLIMATIQUES DANS LE MILIEU MARIN	1
1.1.1 <i>La variation de température des océans.....</i>	<i>1</i>
1.1.2 <i>L'acidification des océans</i>	<i>3</i>
1.1.3 <i>Les variations de salinité des océans</i>	<i>5</i>
1.1.4 <i>Les polluants</i>	<i>6</i>
1.1.5 <i>Impact sur les milieux marins.....</i>	<i>8</i>
1.2 KERGUELEN	9
1.2.1 <i>Historique et découverte.....</i>	<i>9</i>
1.2.2 <i>Positionnement stratégique.....</i>	<i>10</i>
1.2.3 <i>Base de recherche</i>	<i>11</i>
1.2.3 <i>Sites d'intérêts pour l'étude les moules de Kerguelen.....</i>	<i>12</i>
2. LA MOULE POUR ÉVALUER L'ÉCOSYSTÈME MARIN	14
2.1 LA MOULE COMME ESPÈCE SENTINELLE.....	14
2.2 LE SYSTÈME CIRCULATOIRE DES MOULES	14
2.3 IMMUNITÉ DES MOULES	16
2.3.1 <i>Les hémocytes.....</i>	<i>16</i>
2.3.2 <i>L'immunité cellulaire.....</i>	<i>18</i>
2.3.3 <i>La reconnaissance du non-soi.</i>	<i>19</i>
2.4 LES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE MOULES DE KERGUELEN	19
2.4.1 <i>Mytilus edulis desolationis et Aulacomya atra</i>	<i>20</i>
2.4.2 <i>Les moulières mixtes.....</i>	<i>20</i>
3. BIOMARQUEURS CELLULAIRES ET CONVENTIONNELS	22
4. NOUVEAUX BIOMARQUEURS INSPIRÉS DE LA RECHERCHE MÉDICALE.....	26
4.1 LA BIOPSIE LIQUIDE	27
4.1.1 <i>Utilisation en médecine</i>	<i>27</i>
4.1.2 <i>Origine du ccfDNA.....</i>	<i>28</i>
4.1.3 <i>Caractéristiques (quantification et longueur).....</i>	<i>29</i>
4.1.4 <i>Non-soi.....</i>	<i>29</i>
4.2 L'APPROCHE MULTI-OMIQUE.....	30
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	34

5 . CHAPITRE II: ÉTUDE COMPARATIVE DE LA RÉPONSE HÉMOCYTAIRE ENTRE LES DEUX ESPÈCES DE MOULES DE KERGUELEN, MYTILUS EDULIS DESOLATIONIS ET AULACOMYA ATRA	36
6. CHAPITRE III: LES HÉMOCYTES RELARGUÉS DANS L'EAU DE MER AGISSENT COMME UN CHEVAL DE TROIE POUR DISSIMINER L'INFECTION	50
7. CHAPITRE IV: LA BIOPSIE LIQUIDE APPLIQUÉE À UNE APPROCHE MULTI-OMIQUE CHEZ LA MOULE SENTINELLE	67
8. CHAPITRE V: DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	85
8.1 COMPARATIF DE LA RÉPONSE HÉMOCYTAIRE ENTRE LES DEUX ESPÈCES	85
8.2 LE RELARGAGE EXTERNE D'HÉMOCYTES FACE AU STRESS THERMIQUE.	86
8.3 NOUVELLE LOGISTIQUE D'ÉCHANTILLONNAGE ET APPROCHES MULTI-OMIQUES	88
8.4 BIOPSIE LIQUIDE ET CCFDNA : VERS UNE APPROCHE MULTI-OMIQUE.....	92
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	96
BIBLIOGRAPHIE	97
9. ANNEXE 1	109
10. ANNEXE 2	110
11. ANNEXE 3	111
12. ANNEXE 4	112
13. ANNEXE 5	122

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Température de surface des océans de 1880 à 2015 d'après NOAA 2020.....	2
Figure 2	Changements annuels des différents paramètres de la Mer de Beaufort.....	4
Figure 3	Température moyenne (°C) à Port aux Français.....	10
Figure 4	Sites d'échantillonnages communs avec l'équipe Proteker.....	13
Figure 5	Représentation du système de circulation semi-ouvert des nutriments.....	15
Figure 6	Répartition de l'origine cellulaire des fragments de <i>ccfDNA</i>	29

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Caractéristiques des sites de prélèvements de Kuerguelen	12
Tableau 2.	Caractérisation des sous-populations d'hémocytes de <i>Mytilus edulis</i>	18
Tableau 3.	Caractéristiques générales des deux espèces de moules.....	21
Tableau 4.	Résumé des biomarqueurs conventionnels utilisés chez les bivalves.....	24

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc	ADN complémentaire
AIF-1	Facteur 1 inflammatoire d'allogreffe
AMOC	<i>Meridional Overturning Circulation</i>
CC	Changement climatique
ccfDNA	ADN libre circulant
ctDNA	ADN tumoral circulant
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CO1	Cytochrome oxydase sous-unité 1
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
EDTA	Acide ethylenediaminetetraacetic
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FTA	<i>Flanders Technology Associates</i>
GST	Glutathione S-tranférase
HLA	Antigène leucocytaire humain
IPEV	Institut Polaire Paul-Émile Victor
MIF	Facteur d'inhibition de la migration des macrophages
miRNA	MicroARN
mtDNA	ADN mitochondrial
NCLDV	Virus géant à ADN nucléocytoplasmique
NGS	Séquençage de nouvelle génération
NOAA	<i>National Oceanic and Atmospheric Administration</i>
PAH	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
PAMP	Patterns moléculaires associés aux pathogènes
PCB	Biphényl polychlorés
PRR	Récepteur de la reconnaissance de motifs
PSU	<i>Practical Salinity Unit</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superoxide dismutase
TLR	<i>Toll like receptor</i>

TNF α Facteur alpha de nécrose tumorale
UNEP Programme des Nations Unies pour l'Environnement

CHAPITRE 1

1 LES CHANGEMENTS CLIMATIQUES DANS LE MILIEU MARIN

1.1 Le milieu marin : paramètres abiotiques

Les évidences se multiplient à l'effet que les changements de température impactent rapidement sur le milieu marin. Les océans absorbent les variations de chaleur, de CO₂ et autres gaz relâchés dans l'atmosphère en neutralisant ceux-ci (Caldeira et Wickett, 2003), rendant moins disponible le calcium important à la composition des coquilles et enveloppes exodermiques des mollusques marins tels les bivalves (Perez et al. 2018). De plus, les cycles naturels peuvent être désynchronisés. Par exemple, l'apparition hâtive de chaleur en surface peut favoriser certains organismes au détriment de d'autres tels les larves de poissons osseux et le zooplancton, apparaissant 6 jours avant leur réserve de phytoplancton (Poloczanska et al. 2013). Les scientifiques portent une attention particulière aux paramètres physico-chimiques comme la température, l'acidification, la salinité, les polluants chimiques tels les composés dioxines, les biphenyls polychlorés, les pesticides, les hydrochlorés et les métaux lourds. Ces travaux de recherche donnent une information sur la qualité de l'environnement de la moule, de son état de santé ainsi que des risques socio-sanitaires qui y sont associés. L'étude plus particulière des écosystèmes du littoral sur des décennies, basées sur la mesure de facteurs biotiques et abiotiques clés, analysés en tenant compte de l'activité humaine environnante constitue un bon défi (Feyrer et al. 2015). Notre objectif n'est pas de départager l'influence de chaque facteur mais de connaître les changements additifs globaux sur un écosystème en particulier.

1.1.1 La variation de température des océans

La première mesure en profondeur de la température de l'océan a été enregistrée lors d'un voyage de Capitaine James Cook en 1772 (Cook 1777). Depuis, les méthodes de mesure de températures se sont standardisées en prenant compte de l'effet de la pression de l'eau (Abraham et al. 2013). Les relevés sont maintenant effectués à l'aide d'un bathythermographe consommable. Cet instrument est lancé d'un navire et enregistre les données de pression barométrique et de température au fur et à mesure qu'il progresse vers le fond marin, relayant

les données au navire en temps réel. En 2017, 15 933 déploiements ont eu lieu dans les différents océans selon les données du programme "Ship of Opportunity" (SOOP). Les données recueillies ont permis entre-autre de documenter l'augmentation de la température des eaux de surface (Steinhoff et al. 2019). Ainsi, les trente dernières années ont montré une hausse soutenue et plus marquée. De 1901 à 2015, elles ont augmenté de 0.13°F par décennie (NOAA 2016) (**Figure 1**). Par ailleurs, les milieux côtiers sont plus susceptibles à des changements rapides de leur écosystème (He et Silliman, 2019) car ils sont assujettis à des changements de température influencés par leur géographie (baies, estuaires, lagons, mers, intérieures, etc.) des effluents d'eau douce, des vents qui favorisent la resuspension des sédiments marins et des effets anthropiques régionaux. Dans la Baie de Chesapeake, aux États-Unis, sur une période s'étendant de 1966 à 2002, l'huître *Crassostrea virginica* a diminué la surface de son territoire d'occupation (Mackenzie Jr 2007) au détriment d'autres espèces envahissantes telle le noyer de mer *Mnemiopsis leidyi*. La combinaison du changement de la température à la hausse (1°C de plus en moyenne entre 1960 et 1990) et l'enrichissement des nutriments, qui ont causé une augmentation de la chlorophylle- α et une hypoxie, sont parmi les facteurs en cause (Kimmel et al. 2012). À long terme, les autres espèces telles les crustacés copépodes *Acartia tonsa*, les méduses *Chrysaora quinquecirrha* (Decker et al. 2007) et les poissons ont également diminué, témoignant d'une eutrophisation probable du milieu.

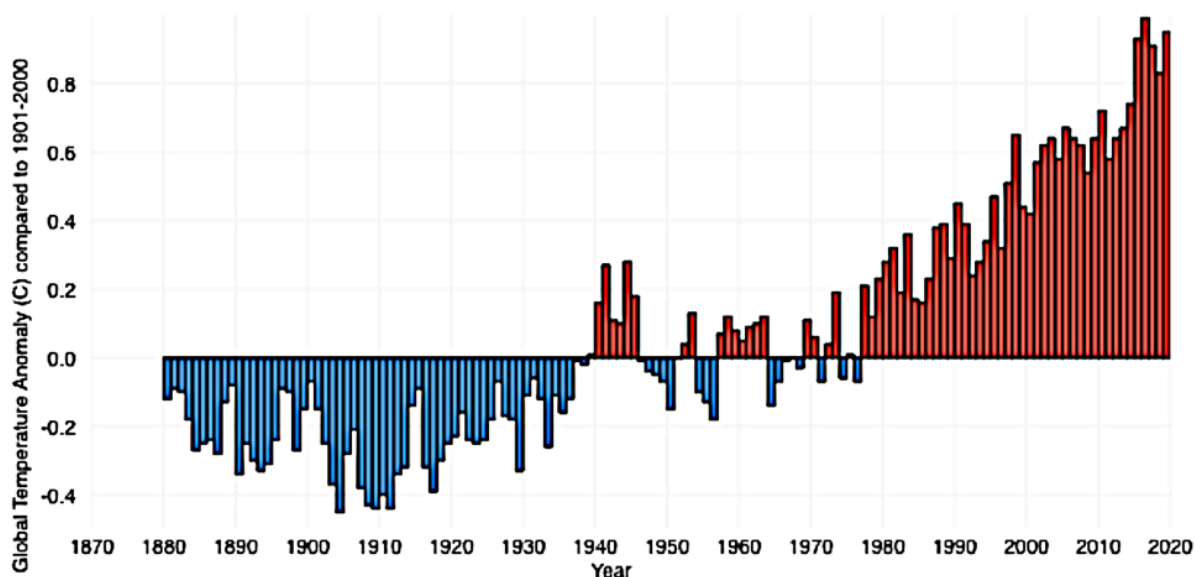


Figure 1. Température de surface des océans de 1880 à 2015 d'après NOAA 2020.

Certaines espèces tolèrent mieux les variations de température. Ainsi la fenêtre de tolérance aux extrêmes de température de *Mytilus edulis* provenant de la mer des Wadden en Norvège, correspond à 41.73°C, soit de -13.4°C à 28.34°C (Compton et al. 2007). Il est surprenant que la limite de température supérieure, qui correspond à une mortalité de 50%, ne soit pas plus élevée, d'autant plus qu'elle peut être exposée au soleil à marée basse. De plus, les différents organismes provenant du même endroit démontrent une capacité supérieure à tolérer la chaleur. Cette tolérance s'explique en autres par la forme de colonie en groupe, qui est attachée serrée avec ses byssus, et qui lui procure un moyen de conserver une température moins élevée (Helmuth et al. 2002).

1.1.2 L'acidification des océans

De l'ère préindustrielle à aujourd'hui, le pH des eaux de surface océaniques s'est acidifié de 0.1 unité passant de 8.179 à environ 8.069 (Feely et al. 2010). La quantité croissante de dioxyde de carbone (CO₂) relâchée dans l'atmosphère et absorbée par les océans contribue à l'acidification des océans (Caldeira et Wickett, 2003). Cette acidification diminue la disponibilité de l'Aragonite, la forme cristalline du carbonate de calcium CaCO₃ qui entre dans la composition de la coquille de l'ectoderme et de l'endosquelette des animaux marins (Orr et al.2005). La diminution de l'Aragonite est d'autant plus marquée en Arctique à la Mer de Beaufort (**Figure 2**) où la disparition de la glace a favorisé ce phénomène (Zhang et al. 2019). Plus près de nous, dans l'estuaire marin du Saint-Laurent, une baisse du pH marin s'accroît depuis des décennies, particulièrement dans les profondeurs de 170m et plus (Mucci et al.2011). Ces changements impactent sur certains mollusques et échinodermes qui possèdent des mécanismes lents d'homéostasie acido-basiques de l'hémolymphe (Whittman 2013), les rendant plus vulnérables à un rapide changement de pH dans leur environnement. Par exemple, les larves de quelques jours de vie, n'ayant pas leur enveloppe minérale (prodissoconch) et soumises au stress des changements rapides de saturation en CO₂ des régions côtières, démontrent une réduction des réserves d'énergie ainsi qu'un plus grand risque de létalité (Waldbusser et al. 2015). En contrepartie, la réponse adaptative des bivalves à un changement chronique de CO₂ se situe au niveau de la prochaine génération de larves qui possède un taux de métabolisme standard augmenté par rapport aux larves des géniteurs non exposés à une CO₂ élevée, leur conférant une certaine résistance. Une méta-analyse des embryons et larves de moules étudiant l'effet d'un stress de

température, de pH et de salinité a démontré une sensibilité accrue des larves à un changement de température et de pH (Przelawski et al. 2015).

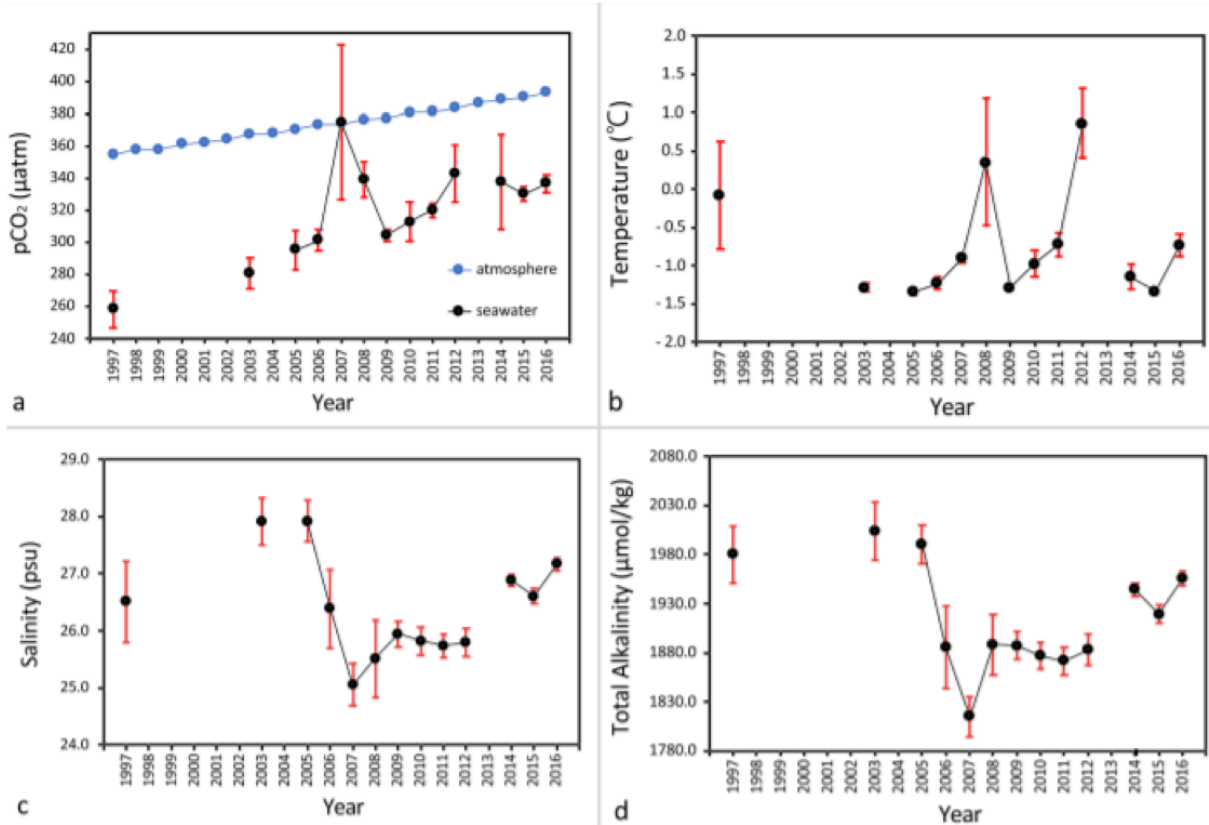


Figure 2. Changements annuels des différents paramètres de la Mer de Beaufort.
Variation de (a) l'acidification, de (b) la température moyenne, (c) la salinité et (d) l'alcalinité.
(Selon Zhang et al. 2019).

L'acidification de la région subantarctique à proximité de l'Archipel de Kerguelen a fait l'objet de plusieurs campagnes d'étude via les programmes de recherche de l'Institut Polaire Français Paul-Émile Victor (IPEV) dont le programme KERFIX de 1990 à 1995. Il consistait à effectuer des relevés mensuels des taux d'oxygène et de CO₂ marins et à la surface de l'eau, à 97 km au sud-ouest de Kerguelen. En plus de la température, la salinité et des lectures de P, Si, NO₃, NH₄ et chlorophylle étaient enregistrés (Jeandel et al., 1998). Des relevés similaires ont continué avec le programme KEOPS en 2005 et KEOPS/OISO 20 en 2011. Ces études ont pu mettre en évidence la complexité du blooming du phytoplancton, qui dépend non seulement de la température (moins de CO₂ en eau froide) mais surtout de la disponibilité du fer nécessaire à la fertilisation. Dans la région Sub-Antarctique de Kerguelen, les variations de pH n'ont pas été retenues comme un élément expliquant le blooming du phytoplancton.

1.1.3 Les variations de salinité des océans

Il est maintenant bien connu que les variations de salinité à la surface de l'eau évoluent selon des cycles saisonniers, particulièrement dans les régions polaires (Garcia-Eidell et al. 2019). La fonte et le gel des glaciers, les vents violents qui ramènent l'eau plus profonde à la surface, les différents courants marins, l'évaporation et les précipitations sont des facteurs qui peuvent faire varier la salinité (Farrar et Plueddemann, 2019). Depuis 1896, en Arctique et Subantarctique, les données de température et de salinité ont été colligées à partir de bateaux mercantiles et météorologiques, et ce plus particulièrement au sud de Terre-Neuve jusqu'à l'Islande ainsi qu'une autre voie couvrant la Mer du Nord jusqu'au Groenland. En plus, des échantillons d'eau ont été prélevés afin de diminuer les biais des thermosalinographes. Selon les données recueillies, la salinité augmente au sud du 54°N (Terre-Neuve) et à l'ouest du Bassin Islandais, le long du 59°N. Depuis 1995, au niveau de la Mer du Labrador, un changement de densité de l'eau démontrant une « eau plus douce » a été enregistrée en profondeur pouvant expliquer une diminution de la circulation du « Meridional Overturning Circulation » (AMOC) (Bryden et al.2005; Srokosz et al. 2012). L'eau de surface est demeurée plus froide et moins dense dans l'Atlantique Nord et plus chaude et salée au sud du 54°N (Terre-Neuve) et à l'ouest du Bassin Islandais, le long du 59°N (Somavilla et al.2012). L'effet net de la diminution du courant serait un refroidissement de l'Atlantique Nord, corroborant les observations de la dernière décennie (Robson et al. 2016)

Le long du continent Antarctique, quatre sites ont été étudiés afin de déterminer la température, la salinité et la teneur en CO₂ des eaux profondes de 1000 à 1500 m (Bindoff et Hobbs, 2013). La tendance générale est une diminution de la salinité et une augmentation de la température des eaux profondes. Deux des sites étudiés depuis 1994 montrent une accélération de ce phénomène qui pourrait être lié à l'apport plus important de rivières glacières ou des changements provoqués, comme ce fut le cas en 2010, par la collision entre le continent et les glaciers du Bassin Australien-Antarctique, entraînant ainsi des changements dans la morphologie géographique des lieux (Menezes et al., 2017). Les observations de la salinité en surface ont également montré que les régions salées deviennent plus salées et que les régions moins salées deviennent plus « fraîches » (Bindoff et Hobbs, 2013). Ceci peut représenter un stress de plus pour les organismes marins, notamment chez les bivalves qui doivent s'adapter au nouvel environnement des écosystèmes marins côtiers. Bien que certaines études ont démontré que les moules bleues (*Mytilus* sp.) semblent s'adapter au stress de salinité, pouvant survivre en

moyenne 1052 jours à 15.0 unités de salinité (PSU) et tolérer des écarts de salinité de 10.5 à 36.0 PSU (Van der Gaag et al., 2016), des changements de salinité peuvent avoir un impact sur leur réponse immunitaire et les rendre vulnérables aux infections (Reid et al. 2003; Zuykov et al. 2020). Selon Matozzo et Marin (2011), la phagocytose et les comptes hématocytaires des bivalves diminuent en hyposalinité alors qu'ils augmentent en hypersalinité. La phagocytose a cependant été peu étudiée en hypersalinité. Au niveau de l'hémolymphe, l'osmolalité et les concentrations en ions Na^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+} correspondent aux valeurs du milieu environnant hyposalin auquel on les a exposées (Shumway 1977).

1.1.4 Les polluants

Les substances qui peuvent nuire ou altérer l'écosystème du littoral marin font l'objet d'une surveillance à long terme par plusieurs organisations, tel le programme américains *Mussel Watch*. Ce programme, créé en 1986 par le *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA), surveille la présence chez la moule de 140 contaminants d'intérêt. Les polluants étudiés se regroupent : 1) Les métaux, tels que le zinc, le cuivre, l'aluminium, l'antimoine, l'arsenic, le cadmium, le chrome, le plomb, le manganèse, le mercure, le nickel, le sélénium, l'argent, le thallium et le tin, 2) les contaminants organiques, tels les congénères des biphényles polychlorés (PCB), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), le butyltin, les insecticides ; dichlorodiphényltrichloréthane (DDT), chlordane et dieldrines, 3) les parasites des bivalves, et 4) les contaminants microbiens dans les sédiments entourant les moules, tel le *Clostridium perfringens*. Les résultats de ce suivi permettent entre-autre de mesurer l'impact de décisions politiques et des activités anthropiques sur l'écosystème aquatique aux États-Unis.

Afin qu'un métal soit toxique, il doit se trouver sous une forme métabolique active et biodisponible (Luoma et Rainbow, 2011). L'apport en métal doit surpasser le rythme de désintoxication ou d'excrétion. De plus la toxicité sur certaines cellules, tissus ou organismes entiers doit en être démontrée. Le cadmium est un polluant qui fait l'objet d'un intérêt particulier considérant qu'il ne joue aucun rôle dans les processus physiologiques de tout être vivant. On retrouve le cadmium à l'état naturel en lien avec d'autres métaux, tels les gisements de zinc, en lien avec les activités volcaniques, lors des processus d'érosion des sols, ou dans les embruns marins. Selon le programme des Nations Unies pour l'Environnement (UNEP), les sources anthropiques de cadmium dans le sol sont dans l'ordre décroissant : l'utilisation du charbon, les déchets urbains,

les opérations minières et l'agriculture. Au niveau atmosphérique, les émissions de cadmium proviennent principalement de fonderies produisant des métaux non-ferreux suivi de la combustion du pétrole. La contamination des milieux marins provient principalement de la déposition du cadmium atmosphérique ainsi que par l'érosion naturelle. Des études sur la mesure de cadmium dans l'hémisphère sud à partir de carottes récoltées dans le fond de l'océan et sur le continent Antarctique démontrent que les concentrations de cadmium actuelles (environ 0.4 nM à la surface et jusqu'à 0.8 nM en profondeur) seraient comparables à celles retrouvées au cours des cent-quatre-vingt dernières années (Nolting et al. 1991; Planchon et al. 2002).

Dans la nature, le cadmium n'existe pas sous forme libre. Les formes les plus fréquentes des composés sont le sulfate de cadmium (CdSO_4), suivi du carbonate de cadmium (CdCO_3) et de l'oxyde de cadmium (CdO). Chez l'humain, une intoxication chronique aux composés du cadmium peut provoquer une apoptose des cellules tubulaires rénales créant une insuffisance rénale et de l'ostéomalacie par le biais de la non transformation de la vitamine D en sa forme active (Johri et al. 2010). De plus une diminution de l'absorption du calcium intestinal va causer de l'ostéoporose (Bernhoft 2013). C'est le cas des intoxications au Japon qui ont débuté en 1912 suite à des déversements riverains de rejets miniers et qui a donné le nom de Itai Itai à la maladie en référence aux douleurs sévères engendrées chez les personnes intoxiquées. En 2012, l'Agence Internationale de Recherche en Cancer (IARC) a statué qu'elle possédait suffisamment de preuves fournies par les recherches épidémiologiques chez les patients ayant les taux sanguins les plus élevés de cadmium ainsi que par les études de toxicité chez les rongeurs pour considérer le cadmium en tant qu'agent cancérigène (Garcia-Esquinas et al. 2014). Il peut notamment induire un cancer du poumon. Le lien avec le cancer rénal et de la prostate est plus difficile à établir car d'autres composés peuvent être en cause. Selon l'organisme américain *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, la demi-vie du cadmium dans le rein est de 6 à 38 ans et de 4 à 19 ans dans le foie. Au niveau des mécanismes d'actions cellulaires et moléculaires chez les vertébrés le cadmium induit la production de superoxyde chez les macrophages pouvant entraîner des défauts dans la réparation de l'ADN et la prolifération cellulaire (Valko et al. 2006). Le cadmium interagit avec plusieurs voies de signalisations mitogènes dont l'inhibition de la réponse de p53 aux dommages de l'ADN.

Le cadmium a fait l'objet de biosurveillance chez les bivalves depuis les années 80 aux États-Unis (Beliaeff et al. 1997). Le cadmium s'accumule principalement dans le manteau et dans l'organe digestif de la moule. Pour un même site, il peut exister une légère différence dans la

bioaccumulation entre deux mytilidés comme *Aulacomya atra* et *Mytilus chilensis* (Tapia et al. 2010). De plus, le cadmium est un contaminant très utilisé pour l'étude du système immunitaire chez les bivalves. Les courbes doses-réponses d'exposition des hémocytes au chlorure de cadmium en rapport à la phagocytose ont démontré une variation de l'inhibition selon l'espèce de bivalve (Sauvé et al. 2002). Lorsqu'il s'agit de l'exposition de l'animal entier, comme chez *Mytilus edulis* à des concentrations croissantes de cadmium, 20 à 50 ug/L, sur 11 jours, une diminution du compte hémocytaire a été observée mais aucun changement significatif au niveau de la phagocytose ou de la mesure de la concentration de la superoxyde dismutase (SOD) des hémocytes (Sheir et Handy 2010). Des études transcriptomiques récentes dans un modèle d'exposition directe des hémocytes au cadmium (Granger Joly De Boissel 2017), ont toutefois démontré une induction de l'expression des gènes codant pour la SOD, la glutathione S-tranférase (GST), le cytochrome CYP2C8 (impliqué dans la détoxification de xénobiotique), et de la protéine de la multirésistance aux médicaments (MDR). D'autres transcrits de voies métaboliques importantes, tels *Hsp70*, *caspase 8*, et *Toll like receptor (TLR)*, ont également été induits. La divergence des résultats entre les deux types d'expérience peut s'expliquer par une plus grande sensibilité de l'analyse transcriptomique par rapport à un *end point* de la production de SOD. La concentration de cadmium de l'hémolymphe des animaux n'ayant pas été mesurée dans l'étude de Sheir et Handy, il peut s'agir d'une faible concentration qui n'altère pas la phagocytose ou la production de SOD. Il est également possible que ces résultats apparemment contradictoires s'expliquent par le fait que ces études ont été réalisées à des temps d'exposition différents.

1.1.5 Impact sur les milieux marins

L'impact des stress environnementaux sur les milieux marins doivent tenir compte de l'intensité du stress, comme le démontre l'augmentation rapide de la température de l'Océan Indien en 1998 ayant mené au blanchiment de toute la barrière centrale de coraux du Bezile. La température moyenne a augmenté de plus de 2.2°C avec des pointes jusqu'à 4°C (Aronson et al. 2002). Un autre changement, telle une baisse de >1.5 à <0.5 mL/L de l'oxygène de l'océan pacifique secondaire à une augmentation de la température entre les différentes ères de miniglaciacion (16 100 ans à 3 400 ans) a causé une perte de la biodiversité et un remplacement par des espèces extrêmophiles (Moffit et al. 2015). Ces résultats sont corroborés par d'autres études qui démontrent qu'une perte de la biodiversité dans les océans actuels peut être prédite par

l'instabilité de la température des eaux de surface (Tittensor et al. 2010). Certaines régions côtières peuvent ainsi voir la composition de leur population de poissons et d'invertébrés changer. Une étude longitudinale de 35 ans de la population de poissons et d'invertébrés a démontré une migration des poissons tropicaux et des invertébrés vers les zones texanes plus au nord (Fujiwara et al. 2019). Une des hypothèses avancées par les auteurs pour expliquer ce phénomène réside en la notion de tolérance de température maximale pour les différentes espèces. En utilisant un modèle basé sur les prédictions des changements environnementaux des prochaines décennies ainsi qu'en tenant compte des voies de transport maritime et des capacités d'adaptation des espèces, l'Arctique devient une région à risque d'envahissement par certaines espèces (Goldsmith et al. 2018; (Goldsmith et al. 2020). D'autres facteurs pouvant expliquer une résilience écologique aux augmentations de la température des eaux de surface lors des phénomènes *El Nino*, ont été étudiés chez les forêts de laminaires sur les côtes australiennes. Le manque de diversité génétique pourrait expliquer la disparition complète de la forêt de laminaires pour une même vague de chaleur (Wemberg et al. 2018). Enfin, l'augmentation des agents infectieux en contexte d'augmentation des températures marines peuvent également participer à la vulnérabilité notamment chez les bivalves. Par exemple, deux infections à protozoaires (*Perkinsus marinus* et *Haplosporidium nelson*) ont mené à la mortalité de l'huître *C. virginica* des côtes de l'Atlantique Nord (Burge et al. 2014). L'extinction de ces moulières infectées et le taux de mortalité correspondaient aux oscillations anormalement élevées de la température enregistrée (Burge et al. 2014).

1.2 Kerguelen

1.2.1 Historique et découverte

L'archipel de Kerguelen a été découvert par Yves Joseph Kerguelen de Trémarec le 12 février 1772. Cet archipel français représente 7 215 km² d'îles volcaniques qui ont émergé il y a 40 millions d'années. Elles sont localisées à une distance de 2 000 km des côtes de l'Antarctique, entre 48°35' et 49°54' de latitude Sud et entre 68°43' et 70°35' de longitude Est. L'archipel de Kerguelen est devenu une Réserve Naturelle en 2006. L'île principale, Grande Terre, abrite la station de recherche de Port-aux-Français. Elle est entourée de 300 îles satellites. Son centre est occupé par le glacier Cook. Ce qui en fait un site particulier pour des études immunotoxicologiques chez la moule est principalement l'abondance de ses moulières mixtes

comprenant la moule bleue (*Mytilus edulis desolationnis*) et la moule striée (*Aulacomya atra*). Les moulières sont accessibles par la marche depuis Port-aux-Français ou par bateau. De plus, les moulières sont constamment en lien avec une faune environnante diversifiée et avec des particularités propres à chacun des sites (**Tableau 1**).

1.2.2 Positionnement stratégique

Étant situé à la rencontre de l’Océan Indien, d’une part, et l’océan Austral plus au sud, la température extérieure à Kerguelen varie peu. La moyenne annuelle est de 4.5°C avec des minima qui ne dépassent pas -10°C et des maxima ne dépassant pas les 20°C. Cependant, la tendance de la température terrestre moyenne est nettement à la hausse depuis les soixante dernières années (**Figure 3**). Les vents d’ouest intenses qui poussent

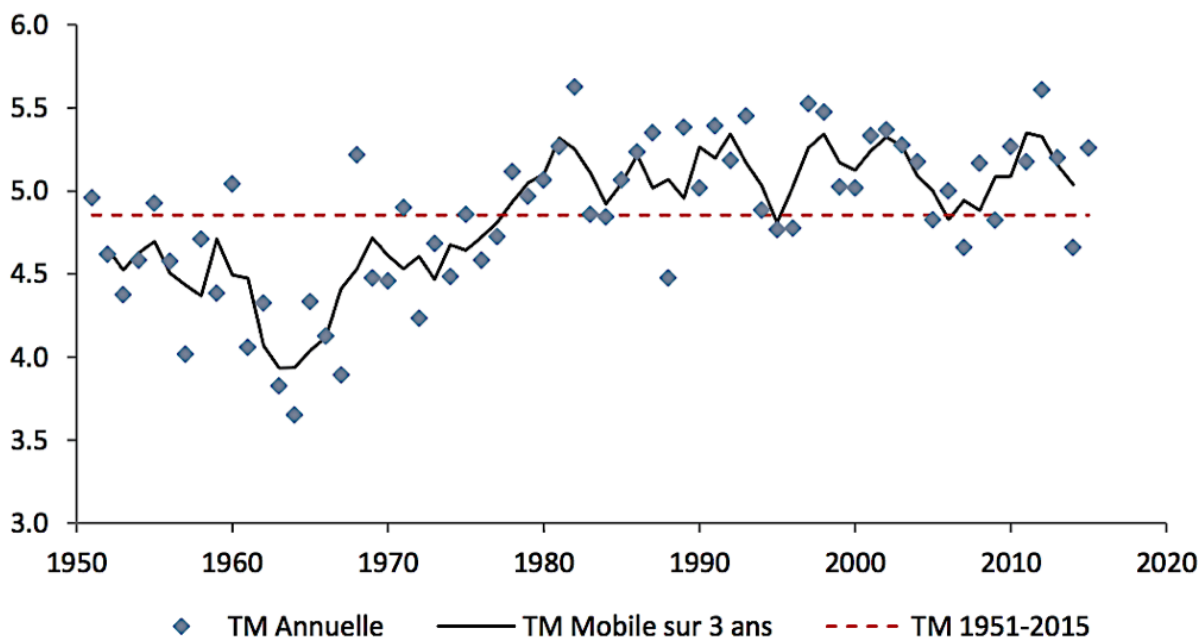


Figure 3. Température moyenne (°C) à Port aux Français.

Données compilées par IPEV 136-UMR 6553

le courant circumpolaire d’ouest en est, rencontre des courants opposés provenant de courants subtropicaux. Le tout résulte en une mixité chaud-froid des différentes couches de l’océan qui peuvent atteindre 100 m l’été et jusqu’à 400 m en hiver (Bowie 2015). De plus, la fonte des glaciers et l’apport de rivières d’eau douce qui se jettent dans les bras

d'eau salée donnent des lectures de salinité et de pH qui varient d'un site de prélèvement à l'autre (Morat et al. 2008). La fonte du glacier Cook a démontré un recul de 1 km entre 1799 et 1965 ainsi qu'une accélération du phénomène entre 1966 et 1993 soit 3 km (Frenot et al. 1993). Comme il y a peu d'activité humaine, ceci en fait des sites propices à y établir un observatoire de base pour fin de comparaison avec des sites pollués ou sollicités par les activités anthropiques. Les îles de Kerguelen forment l'étendue marine protégée la sixième en importance mondialement. Elles y accueillent une diversité de la faune et de la flore unique en raison des conditions de température, de pH, de mixité des eaux salines et d'eaux douces. Les poissons en eau peu profonde se limitent à quelques grandes gueules et à la truite introduite à Kerguelen. Les moulières y sont abondantes, souvent mixtes et facilement accessibles à marée basse cependant aucune étude visuo-spatiale n'a encore répertorié celles-ci. Les marnages sont de type semi-diurne et peuvent atteindre jusqu'à 2.13m (Vidal et al. 2012). Elles côtoient également une faune marine comportant des colonies d'éléphants de mer et des manchotières. Les colonies d'oiseaux marins y sont variées (cormorans, goélands, pétrels, sternes, etc...).

1.2.3 Base de recherche

La base de Port-aux-Français, qui existe depuis 1955, est accessible uniquement par bateau. Le Marion Dufresne, un navire de recherche et de ravitaillement, effectue quatre rotations par an pour amener le personnel scientifique et de soutien aux différentes bases de recherche en région subantarctique en plus de permettre la participation à des campagnes océanographiques, autour des îles et en mer. L'été, on y retrouve une centaine de personnes sur base. L'hiver, il reste environ 50 "hivernants". Le laboratoire de recherche de la mer (Biomar) permet de faire des expériences en laboratoire. L'IPEV, un groupement d'intérêt public créé en 2002, facilite la logistique et appuie les chercheurs français et leurs collaborateurs dans les régions Antarctiques, Subantarctiques et Arctiques. Le programme ImmunotoxKer 409 de l'IPEV étudie les effets de changements globaux sur les organismes sentinelles, en l'occurrence les salmonidés et les moules, dans un but d'établir un observatoire d'écotoxicité dans un continuum eau douce-eau salée à Kerguelen. Lors de la campagne 2018-2019, ce programme s'est associé avec le programme Proteker, dont les objectifs sont de conserver et de protéger le milieu marin de Kerguelen en établissant une base de données pour un monitoring écologique et génétique. Les deux

programmes sont complémentaires puisque les espèces étudiées diffèrent. Le programme ImmunotoxKer se situe au niveau du littoral jusqu'à 5 mètres de profondeur. Les spécimens sont également pêchés dans les rivières d'eau douce. Les sites d'échantillonnage pour le prélèvement des moules ont été harmonisés avec le programme de Proteker pour des raisons de logistique et pour obtenir des données d'observation à long terme sur la température et le pH de l'eau.

1.2.3 Sites d'intérêts pour l'étude les moules de Kerguelen

Les sites ont été choisis en fonction de leur situation géographique, l'apport varié en eau douce, la faune diversifiée ainsi que l'accès au site (**Tableau 1**).

Tableau 1. Caractéristiques des sites de prélèvements de Kerguelen.

Lieu	Latitude	Longitude	Type de moulière	T (°C) à 5 m de profondeur *	Caractéristiques du site
Anse Saint-Malo	-49.360973	69.854686	<i>Mytilus desolationis</i>	N/A	Situé sur la péninsule Courbet, dans le Golfe du Morbihan.
Anse des écueils	-49.507751	69.691277	Mixte	N/A	Colonie de cormorans, de goélands et éléphants de mer en amont. Albatros et fuligineux en petit nombre.
Armor	-49.462654	69.695549	<i>Mytilus desolationis</i>	N/A	Éléphants de mer, goélands et cormorans. Chats, lapins et rats. Élevage de truite de 1982 à 1992
Îlot Channer	-49.382401	70.185242	Mixte	2.96 à 8.07	Éléphants de mer, goélands et cormorans
Île Haute	-49.374404	69.883314	Mixte	3.11 à 7.61	Colonie de Chionis, mouflons introduits en 1957 sur l'île. Il en reste un seul.
Port aux Français	-49.348835	70.219383	Mixte	2.45 à 8.61	Baie en face de la base de recherche. Colonie de goélands.

- 2016-2017 (Proteker.net)

Une des difficultés rencontrées lors de l'échantillonnage aux sites éloignés demeure la conservation de la chaîne de froid ou bien de ramener les moules entières bullées et conservées dans l'eau de mer froide. Les sites sont soit à quelques jours de marche de la base ou à plusieurs jours en chaland ou avec la Curieuse, un ancien chalutier converti pour des expéditions scientifiques dans les Terres Australes et Antarctiques Françaises (**Figure 4**). L'utilisation de glace sèche requiert des manœuvres de dissection ou de prélèvements d'hémolymphe tout en étant préoccupé par le temps maximal de conservation de la glace sèche de quatre jours. Les tempêtes étant fréquentes, le programme de récupération des manipeurs est toujours sujet à changements de dernière minute et peut être repoussé de plusieurs jours, au risque d'altérer la



Figure 4. Sites d'échantillonnages communs avec l'équipe Proteker

qualité des échantillons. Le poids des échantillons doit être réparti sur un plus grand nombre de manipeurs et représente un plus grand défi pour traverser à pied les chaînes de montagnes. Ces

contraintes sont d'ailleurs communes à l'échantillonnage en région éloignée, notamment en région polaire.

2. LA MOULE POUR EVALUER L'ECOSYSTEME MARIN

2.1 La moule comme espèce sentinelle

La moule est un animal filtreur répandu partout sur la planète, en eau douce comme en eau salée. Elle est facile à récolter et les protocoles de prélèvements ont été très bien établis à travers les années au point où les communautés locales peuvent participer à des programmes de biosurveillance comme *Mussel Watch* ou le programme européen *Mediterranean Mussel Watch* (MMW), qui englobe la participation de 20 pays en Europe depuis 2002, (Baena et Thébault 2007). La moule filtre une grande quantité d'eau de mer, jusqu'à environ 4,8 l/h pour une moule moyenne *M. californius* de 25 g de poids humide (Riisgård 2001). Elle peut accumuler des polluants chimiques, elle possède une faible capacité à métaboliser les contaminants organiques et elle survie à des niveaux modérés de pollution (Farrington et al. 2016). Ainsi, les concentrations des différents polluants des tissus mous des moules sont comparées sur différents sites afin de mieux comprendre l'impact et l'évolution de ceux-ci sur un écosystème particulier (Goldberg et Bertine, 2000). La moule représente également une valeur économique importante avec une production mondiale annuelle oscillant autour de 200 000 tonnes (FAO 2017). Le Canada a produit 25 800 K tonnes en moyenne entre 2011 et 2015 dont 80% proviennent de l'Île-du-Prince-Édouard (Pêches et Océans Canada, 2017).

2.2 Le système circulatoire des moules

Le système circulatoire des moules est considéré comme « semi-ouvert ». Le taux de filtration dépend de la quantité de nutriment, la grosseur des particules, l'ouverture de la valve, qui peut elle-même être influencée par la présence de métaux lourds et la concentration des algues (Riisgård et al., 2011). En premier lieu, l'eau entre dans le siphon inhalant qui est un repli du manteau. Le manteau et ses siphons forment la cavité palléale. L'eau traverse ensuite les branchies. Les cils des branchies poussent les nutriments vers la bouche. Le circuit continue vers l'œsophage, la glande digestive puis les nutriments voyagent vers le rectum. L'anus s'ouvre dans

le siphon exhalant. La cavité péricardique et même le ventricule sont traversés par le rectum. Ceci permet l'évacuation rapide d'eau pour assurer que l'hémolymphe demeure iso-osmolaire et pour évacuer rapidement des toxines tel le surplus des ions ferreux. Les particules qui sont trop volumineuses sont repoussées vers le liquide palléal pour être évacuées par le siphon exhalant (Figure 5).

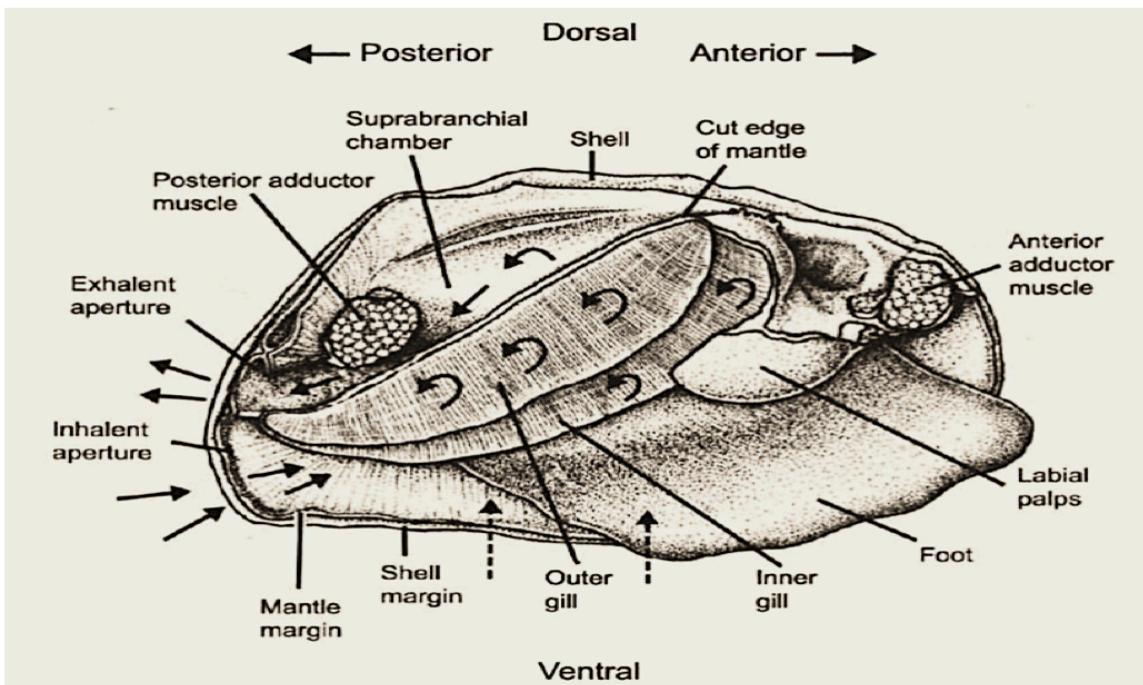


Figure 5. Représentation du système de circulation semi-ouvert des nutriments de l'eau de mer de la moule *Margarifera auricularia* (Soler et al, 2019).

En second lieu, il existe un système circulatoire avec un cœur qui pompe l'hémolymphe (équivalent du sang) et les hémocytes (les cellules de l'hémolymphe) dans les différents organes. Le circuit sanguin débute au niveau de la base du pied, puis passe par les branchies. De là, l'hémolymphe est pompée vers les deux oreillettes et passe dans l'unique ventricule. Deux aortes sont branchées au ventricule et assurent la distribution de l'hémolymphe dans les différents tissus. Il n'existe pas de capillaires chez la moule. Seulement des veines, des artères et des sinusoïdes entre l'apport et le retour veineux. L'accessibilité à ces cellules et hémolymphe se fait en ponctionnant le muscle adducteur. Les comptes lymphocytaires normaux des bivalves démontrent une grande variabilité individuelle tels les comptes de *Crassostrea virginica* variant

de 4.2×10^5 cellules/ml jusqu'à 15.1×10^6 avec une moyenne de 3.1×10^6 cellules/ml (Ashton-Alcox et Ford, 1998). Les comptes hématocytaires peuvent varier soit à la baisse lors d'un stress bactérien avec une modulation du type d'hématocytes telle une diminution des granulocytes (Ciacci 2009). On peut parler d'hématocytose lorsque les comptes sont très augmentés. Le stress thermique ou une leucémie peuvent induire une telle augmentation.

La moule possède également un système d'homéostasie acido-basique qui tient compte des mouvements des marées et du fait qu'elles sont immergées ou à l'air libre de façon cyclique. Lorsque la moule est submergée, elle ferme sa valve et conserve son eau de mer. Elle maintient ainsi sa glycémie en passant d'un système aérobie (par le cycle de Krebs) à l'utilisation de l'énergie en anaérobie comme la formation du succinate. De plus l'équilibre du pH est maintenu en sécrétant des métabolites qui agissent comme tampon du liquide intervalvaire (Guerra-Rivas et al., 2001). La capacité tampon équivalent à un est sa capacité de changer le pH d'une unité en ajoutant une certaine quantité d'acide ou de base. Dans le cas de l'eau de mer, la capacité tampon (β) est de 3.1725 ± 0.7846 alors que la moule *M. galloprovincialis* soumise à l'hypoxie et à l'exposition aux biphényles polychlorés (PCB) a une capacité tampon de son liquide intervalvaire de $\beta = 28.109$. Un autre processus « tampon » est d'utiliser le carbonate de calcium emmagasiné dans la coquille. Sinon, en présence d'un milieu acide ou en anaérobie prolongé, la moule aura une coquille plus molle et plus vulnérable aux traumatismes.

Bien que l'on connaisse passablement bien le système circulatoire des moules, il en demeure que nous connaissons peu les processus physiologiques qui gouvernent la circulation intra- et extravasculaire des cellules immunitaires de l'hémolymphe et comment ceux-ci sont régulés face à un stress environnemental. Des études seront nécessaires dans ce domaine considérant l'importance de l'immunité pour la réponse aux pathogènes et la fréquence de plus en plus élevée de mortalité de masse dans les moulières causées par des pathogènes en réponse aux changements de température.

2.3 Immunité des moules

2.3.1 Les hématocytes

Les moules possèdent un système immunitaire inné. Contrairement aux vertébrés, elles ne possèdent pas d'immunité acquise. Elles ne peuvent produire d'anticorps. Les cellules qui répondent rapidement à une menace d'infection ou face à autre stress sont les hémocytes. La classification des hémocytes des mytilidés demeure difficile et manque de consensus en raison du manque de connaissance du processus de maturité des hémocytes. De plus, contrairement aux études chez l'humain, il y a très peu de biomarqueurs spécifiques capables de distinguer les différentes sous-populations d'hémocytes, leur origine hématopoïétique et leur état d'activation face au non-soi. Contrairement aux hémocytes, les leucocytes chez l'humain sont bien caractérisés par leurs marqueurs membranaires et leur origine, la moelle osseuse, est bien identifiée. Leur processus de différenciation dépend du tissu où ils migrent.

Le Tableau 2 résume les résultats de Pipe et al., de 1997 sur les hémocytes. Globalement, ces résultats font encore consensus. Une discrimination de trois sous-populations d'hémocytes a été réalisée en utilisant le gradient de densité au Percoll. En y combinant la microscopie électronique, la coloration de Wright, la coloration des enzymes lysosomiaux, la mesure de liaison aux lectines et la phagocytose, le groupe de Pipe a mieux caractérisé les trois types d'hémocytes. Noël et al., en 1994 avaient produit des anticorps monoclonaux afin de bien distinguer les types cellulaires. Toutefois, sur les cinq anticorps produits, un seul identifiait les granulocytes éosinophiles. Les autres anticorps se liaient à tous les types de cellules, sans aucune spécificité. En 2010, le groupe de Frank Le Foll (Le Foll et al., 2010) a identifié les différents hémocytes en utilisant les préparations panoptiques de Pappenheim, commercialement appelées *Hemacolor*. En y combinant les techniques d'imagerie de motilité et de cytométrie en flux, ils purent distinguer les trois populations bien qu'on y retrouve certaines différences par rapport à la classification de Pipe: A) Les hyalinocytes sont plus hétérogènes et plus volumineux que les granulocytes basophiles. Le ratio noyau/cytoplasme étant plus élevé pour les granulocytes basophiles, B) Aucun granule n'est présent dans le cytoplasme des hyalinocytes, et C) selon l'hypothèse de l'auteur, les granulocytes basophiles ne phagocytent pas. On peut donc constater qu'un certain consensus règne pour la lignée d'hémocytes granulaires éosinophiles. Cependant, il sera difficile d'arriver à un consensus concernant les lignées des hyalinocytes et des granulocytes basophiles tant que de nouveaux marqueurs spécifiques ne seront pas développés et permettront de mieux comprendre leurs rôles.

**Tableau 2. Caractérisation des populations d'hémocytes de *Mytilus edulis*.
(Adapté de Pipe et al. 1997).**

Méthode de Percoll	Sous-Population	Microscopie	Coloration Wright	Coloration Arylsulphatase des enzymes lysosomaux	Phagocytose
Couche supérieure	Agranulocytes	- Petites cellules agranulaires - Ratio élevé noyau/cytoplasme	Aucune	Cytoplasmique diffuse	Peu
Couche moyenne	Granulocytes Basophiles	- Petites granules de 0.2 à 0.3µm	Basophile	Cytoplasmique diffuse et dans les granules	Moyen
Couche inférieure	Granulocytes Éosinophiles	- Cellules à larges granules de 0.5 à 1.5µm	Éosinophile	Dans les granules	Élevée

2.3.2 L'immunité cellulaire

La phagocytose est une des fonction clé permettant aux hémocytes d'éliminer les pathogènes et les cellules apoptotiques ou nécrotiques. La phagocytose a été décrite par Underhill et Goodridge en 2012 un peu comme on décrit les phases de dégustation d'un bon vin que l'on hume, dont on apprécie l'âpreté sur la langue, que l'on oxygène en avalant et qu'on évalue la durée des tannins après l'avoir avalé : Le « *tasting, feeling, swallowing and digesting* ». Le « *tasting* » correspond au contact des récepteurs de surface de l'hémocyte avec les substances chimiques du milieu. Le « *feeling* » étant un phénomène dynamique d'invagination de la membrane cellulaire et de ses récepteurs à des fins de reconnaissance, comme les patterns moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) à la surface des bactéries. Lorsque les récepteurs membranaires ont été recrutés à la surface via les *Toll Like Receptors* (TLRs), l'internalisation du complexe bactérie-récepteurs de surface par invagination se produit (« *swallowing* »). Le complexe appelé phagosome digèrera ensuite la bactérie. Les fragments digérés recruteront d'autres récepteurs

membranaires de l'hémocyte. Tout le long du processus de phagocytose, il y a signalement intracellulaire (Underhill et al. 2012). La signalisation via les récepteurs TLR mèneront à la production de cytokines pro-inflammatoires et la production de chémoattractants (David et al. 2019). Le tout se termine avec la libération de peptides antimicrobiens dans l'hémolymphe, tels les defensin, mytilin, mytimycin, etc (Gerdol et al. 2015). Une fois le processus de liaison entre les PAMPs et les récepteurs de la reconnaissance de motifs (PRR) enclenché, les hémocytes procèdent à la phagocytose, à l'élaboration de peptides antimicrobiens et au relâchement d'enzymes lysosomiaux. Parmi les autres facteurs d'inflammation impliqués, on retrouve l'interleukine 17 (IL-17), le facteur d'inhibition de la migration des macrophages (MIF), le facteur 1 inflammatoire d'allogreffe (AIF-1), et le facteur alpha de nécrose tumorale (TNF α) (Gerdol et al. 2018). D'autres facteurs ayant un effet s'apparentant aux cytokines ont été découverts telle la Myticin C, bien connue pour son rôle antimicrobien et son pouvoir chimioattractant pour les hémocytes (Balseiro et al. 2011).

2.3.3 La reconnaissance du non-soi.

À ce jour, nous ne connaissons pas de système de reconnaissance du soi et du non-soi de la moule tel que nous connaissons avec les nombreux gènes du complexe majeur d'histocompatibilité, comme le système HLA (*Human Leukocyte Antigen*) chez l'humain. Le système de reconnaissance des bactéries et des virus par la moule passe par la reconnaissance des PAMPs, un groupe de molécules diverses partagé par des groupes de micro-organismes pathogènes. Ces motifs très conservés dérivent du métabolisme microbien et sont essentiels à leur survie de sorte que la reconnaissance par l'hôte demeure efficace tout au cours de leur évolution (Milutinović et al. 2016). La reconnaissance de ces motifs permet aux hémocytes de reconnaître les éléments du non-soi, dans un but de destruction (Medzhitov et Janeway Jr, 1997). Les PAMPs ont des structures diverses comme des lipopolysaccharides, l'acide teichoïque, les dinucléotides (CpG) caractéristiques des bactéries, ainsi que l'ARN double brin des virus. Sur les cellules hémocytaires, on trouve des récepteurs correspondants aux différents PAMPs, qui sont appelés « *pattern-recognition receptors*, PRR » (Paludan et al. 2020). En plus de les trouver au niveau transmembranaire, certains PRR sont également sécrétés et sont abondants chez la moule.

2.4 Les différentes espèces de moules de Kerguelen

2.4.1 *Mytilus edulis desolationis* et *Aulacomya atra*

La moule *Aulacomya atra* (Molina 1782) est communément appelée la moule striée, *ribbed mussel* en Afrique du Sud, ou *Cholga* en Amérique du Sud. Son nom est inspiré des lignes surélevées sur sa coquille et qui a la forme des côtes d'un mammifère. Son origine remonterait à l'ère du Pléistocène (Rabassa et al. 2008). On la retrouve strictement dans l'hémisphère sud, notamment en Amérique du Sud, en Océanie, aux Îles Subantarctiques et en Afrique du Sud. Elle a été exploitée et cultivée au Chili et en Argentine dans les années soixante-dix, avec une production annuelle de plus de 10 000 tonnes par an (Gallinato 2009). Une surpêche dans les années 90 ainsi que l'engouement pour la moule bleue (*Mytilus chilensis*) ont contribué au déclin de sa valeur économique.

La « moule bleue », *Mytilus spp.* selon la classification de Linnaeus en 1758, fait partie du genre *Mytilus* formé d'un groupe de nombres d'espèces selon leur distribution géographique. L'hémisphère nord comprend *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. californiacus*, *M. coruscus* et *M. galloprovincialis*. Le groupe de l'hémisphère sud est composé de *M. chilensis* et *M. platensis*. Pour des fins de taxonomie, les mytilidés possèdent une caractéristique originale de leur ADN mitochondrial; le sperme contient l'ADNmt M hérité des mitochondries paternelles et les ovocytes contiennent l'ADNmt F hérité de la mère tandis que les cellules somatiques sont hétéroplasmiques (Milani et al. 2013). L'ADNmt M évolue plus rapidement, ce qui permet des études comparatives et phylogéniques qui ont mené à la conclusion que *M. chilensis* et *M. platensis* seraient la même espèce de moule et non deux espèces différentes (Gaitán-Espitia et al. 2016). Concernant l'origine de *Mytilus edulis desolationis* (*M. platensis*) de Kerguelen, il existe un rapprochement avec les moules bleues *Mytilus chilensis* du Chili et de la Patagonie, en se basant sur l'étude des marqueurs génomiques mitochondriaux de l'ARN ribosomal 16S et du locus du cytochrome oxydase sous-unité 1 (Gérard et al. 2008). Les caractéristiques qui différencient les deux espèces de moules de Kerguelen sont résumées dans le **Tableau 3**.

2.4.2 Les moulières mixtes

La moulière mixte est un exemple d'adaptation entre deux espèces de bivalves. Certaines espèces peuvent bénéficier d'une cohabitation avec d'autres bivalves, comme dans le cas de l'huître *Crassostrea gigas* qui a envahi la moulière naturelle de *Mytilus edulis* dans la Mer

Wadden. Avec le temps, il s'avère que *M. edulis*, ensevelie sous des couches de *C. gigas* profite de cette cohabitation en se protégeant ainsi contre la prédation du crabe vert (Reise et al. 2017). D'ailleurs, les jeunes moules migrent vers le bas de la moulière, entre les huîtres et les moules adultes, afin de se protéger.

Tableau 3. Caractéristiques des deux espèces de moules

Particularités	<i>Aulacomya atra</i>	<i>Mytilus edulis</i>	Références
Distribution géographique	Pérou jusqu'au Brésil, Nouvelle Zélande, Îles Australes et Subantarctiques	Océan Arctique jusqu'en Caroline du Sud, Atlantique Nord, Côtes Françaises Atlantiques, côtes du Japon	World register of marine Species FAO Castilla et al., 2000
Profondeur	Intertidal et jusqu'à 20 m	Intertidal et jusqu'à 5 m	Bay-Nouailhat, 2006 Cancino et Bacerra 1978
Croissance	90 mm en 11 ans	50 mm en 5 ans	Bayne et Worral, 1980 Griffiths et al., 1979
Taille (mm)	90 à 170	jusqu'à 100	Bay-Nouailhat, 2006
Distinction anatomique	Stries externes proéminentes Côtes radiales	Aspect lisse et bleu	Observations générales
Capacités de filtration	1L/h (Moule de 50 mm)	1 L/h (Moule de 20 mm)	Riisgard, 2001 Griffiths et King, 1979 b
Adaptation à la température	-1°C à 26°C	-13.4°C à 28.34°C	Compton et al., 2007 Urban, 1994 Davenport et al., 1984
Adaptation aux métaux lourds	Différents mécanismes d'apoptose	↑phagocytose et de l'index phagocytaire	Luengen et al., 2004 Caza et al., 2015
Réponse hémodocytaire au stress thermal	Connaissances fragmentaires	Assez bien connue	Matozzo et Marin, 2007
Profil des protéines hémolymphatiques	Non étudié	Plusieurs séquences peptidiques de protéines caractérisées	Oliveri et al., 2014 Bultelle et al., 2020
Génome	Non séquencé	Partiellement séquencé	Romero et al., 2011
Transcriptome	Non caractérisé	454 transcriptomes publiés	Philipp et al., 2012

Dans certaines moulières mixtes, une espèce peut se montrer supérieure à l'autre. C'est le cas de la moule envahissante *Xenostrobus securus* dont les propriétés d'attachement par le byssus sont plus versatiles et mieux adaptées pour les couches supérieures de la moulière que *M. galloprovincialis* (Babarro et Comeau 2014). Un autre exemple est la moule *M. galloprovincialis* qui peut à son tour profiter de l'avantage de thermorégulation à la baisse par « gaping » de la moule *Perna perna* et se refroidir en sa présence. De son côté, *P. perna* perd de l'efficacité de refroidissement en la présence de *M. galloprovincialis* (Lathlean et al. 2016).

En Afrique du Sud, *M. galloprovincialis* a démontré les caractéristiques d'une moule envahissante principalement dans les zones exposées à des vagues intermédiaires (Zardi et al. 2018). Leur taux de croissance rapide, leur résistance aux parasites ainsi que leur résistance à la dessiccation représentent une menace pour la survie de *A. atra* sur la côte ouest tandis que la moule *P. perna* n'a pas démontré de diminution de la densité de sa population car cette dernière domine la basse côte donc ne partage que la zone intermédiaire côtière avec *M. galloprovincialis*. De plus, la densité de population de *M. galloprovincialis* varie beaucoup annuellement car elle s'attache moins bien que *P. perna*. Elle est donc plus susceptible à l'action des vagues et des tempêtes (Hanekom 2006). Une invasion peut se produire très longtemps après l'introduction d'une espèce de moule. C'est le cas de *Brachidontes pharaonis*, native de la Mer Rouge et introduite accidentellement en Méditerranée lors de la construction du canal de Suez en 1869. Elle a fait l'objet d'observation depuis cette époque. Jusqu'à la fin des années 1980, il était rare de rencontrer cette moule le long des côtes israéliennes. Soudainement, de 1995 à 1999, elle a dominé la moule indigène *Mytilaster Minimus* dans une proportion de 4 à 7 fois la densité populationnelle de cette dernière. Ceci illustre une période très longue de latence pour une espèce qui attend les conditions propices; réapparition de surfaces d'attachement par diminution des algues et supériorité des capacités d'attachement de l'espèce invasive (Rilov et al. 2004).

En ce qui a trait aux moulières mixtes de Kerguelen, leurs longs processus adaptatifs dont l'origine remonterait à l'ère du Pléistocène, tel que déjà décrit, pourraient être mis à l'épreuve dans un contexte de changements climatiques rapides. Un changement d'équilibre pourrait favoriser une des deux espèces.

3. BIOMARQUEURS CELLULAIRES ET CONVENTIONNELS.

Les découvertes en médecine sont souvent une source d'inspiration pour l'écologie. Nous pouvons en juger par exemple par l'historique de l'apparition de différents tests pour l'analyse du microbiome dans les deux disciplines (Escobar-Zepeda et al. 2015). Afin d'évaluer l'état de santé d'un humain, nous procédons habituellement par l'évaluation de marqueurs généraux tels l'indice de masse corporelle, la température, etc. Dans un deuxième temps selon les facteurs de risques, une analyse sanguine plus poussée permettra d'évaluer l'atteinte de certains organes par des biomarqueurs métaboliques, enzymatiques, hormonaux, inflammatoires et hématologiques. De manière plus ciblée, des génotypages de cellules tumorales, l'identification de bactéries, virus ou

parasites pourront également se faire par un prélèvement sanguin. Prenons l'exemple spécifique d'une femme qui souffre d'un cancer du sein métastatique dont les antécédents familiaux sont inconnus. Les biomarqueurs non spécifiques indiqueront une baisse de l'indice de masse corporelle, une anémie légère en phase avancée, une augmentation des facteurs inflammatoires et une augmentation des enzymes hépatiques. Grâce au séquençage ciblé à haut débit, les marqueurs hormonaux et les différentes mutations associées à des résistances aux traitements seront identifiés spécifiquement pour cette patiente (Cho et al. 2012, Miller et al. 2020). Il s'agit d'une approche personnalisée.

Parallèlement, chez la moule, il existe des biomarqueurs généraux, tel que l'indice de condition, des biomarqueurs de l'hémolymphe, tel le compte hématocytaire, et des indices biochimiques comme le dosage de Glutathione-S-Transférase. Cependant, la standardisation et l'harmonisation de ces tests demeurent problématiques bien que certains programmes de surveillance comme Mussel Watch tente de diminuer les écarts en faisant appel aux mêmes laboratoires (Viarengo et al. 2007, Beyer et al. 2017).

Selon le National Institutes of Health (NIH), un biomarqueur est une caractéristique pouvant être mesurée et évaluée de façon objective comme un indicateur de processus biologique normal, pathologique ou bien une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique. En ce qui concerne la santé de l'écosystème marin, un biomarqueur devrait également mesurer les interventions environnementales. Idéalement, un biomarqueur se doit d'être sensible afin de détecter rapidement la toxicité sous forme de dommages cellulaires, tissulaires ou de l'organisme entier. Il doit être à coût faible, facile à utiliser à l'échelle planétaire et basé sur une technologie reproductible dans le temps. La dose-réponse et le temps de réponse doivent être connus (Svendsen et al. 2004). En poursuivant cette optique et afin de pouvoir comparer différents sites de prélèvements, Viarengo (2007) proposait de standardiser la méthode en utilisant des moules de la même espèce, en cage et non exposées préalablement à des polluants et de les acclimater à la température, au pH et à la salinité du milieu. Il ajoutait une approche en deux temps. Un premier dépistage, consistait à tester un écosystème par un test de la stabilité membranaire lysosomale. Ce test est sensible et démontre une bonne corrélation entre la charge de contaminants et l'état de santé de la moule. Sa spécificité demeure toutefois problématique. Dans un deuxième temps, il s'agissait de combiner plusieurs approches conventionnelles et biomoléculaires. Ce type d'approche intéressante se bute cependant à des difficultés en lien avec la nature des biomarqueurs (Tableau 4).

À ces biomarqueurs physiologiques s'ajoutent les biomarqueurs de contamination chimique. Ceux-ci peuvent être divisés en deux groupes : Les biomarqueurs d'exposition et les biomarqueurs de toxicité (Broeg et al. 2005). Les premiers associés à des enzymes de dégradation ou de détoxification des polluants. Ils permettent une réponse rapide et spécifique de détection des polluants. Quant aux biomarqueurs de toxicité, ils correspondent à la manifestation de pathologies induites sur l'animal par un contaminant qui correspond à un niveau aigu ou chronique d'exposition.

Les difficultés avec les biomarqueurs conventionnels chez la moule sont de plusieurs ordres : 1) faible spécificité, 2) interprétation des mesures enzymatiques problématiques par manque de connaissance approfondie des processus physiologiques, 3) difficulté dans la standardisation, et 4) une logistique et des protocoles relativement complexes. La réponse au stress aigu et au stress chronique peut varier selon l'espèce de moule, le tissu impliqué, les mécanismes d'adaptation passant par plusieurs voies enzymatiques (Tomanek 2015). Certains tests exigent également des dissections avec cryoconservation rendant plus complexe la logistique d'échantillonnage dans les régions éloignées avec des conditions extrêmes. L'absence de validation des tests et la reproductibilité des résultats entre les différents laboratoires et les différents expérimentateurs sont aussi un réel problème en comparaison aux laboratoires qui traitent les échantillons humains. Ceux-ci sont soumis à des contrôles réguliers avec des échantillons étalons et un processus de certification garantissant une normalisation des pratiques. Le grand défi demeure également d'identifier des biomarqueurs qui auraient un potentiel prédictif, comme ceux développés en médecine, c'est-à-dire capable d'intervenir avant la manifestation des symptômes ou d'une pathologie.

Tableau 4. Résumé des biomarqueurs conventionnels utilisés chez les bivalves. Adapté de Viarengo et al., 2007.

Méthode	Objectifs	Avantages	Inconvénients
Biomarqueurs de stress			
Neutral Red Retention Time (NRRT) (Lowe and Pipe, 1994; Svendsen et al. 2004)	Mesure semi-quantitative de dommages membranaires.	*Compatible avec métaux lourds, organochlorés et HAP. *Bonne relation dose-réponse	*Le colorant est dommageable pour la membrane lysosomale. *Non spécifique. *Spectre de polluants limité.
Lipofuscine (Viarengo et al. 1987 ; Viarengo et Nott, 1993)	Mesure de stress oxydatif.	*Corrélation avec les dommages lysosomaux	Variation selon les tissus et animaux
Catalase, SOD et GST. (Tomanek 2015)	Mesure des processus anti-oxydants et gestion des ROS.	*Essais calorimétriques standardisés	*Nécessite une chaîne de froide et une grande quantité de protéines.

			*Ne tient pas compte du stress oxydatif mitochondrial.
Oxyradical scavenging capacity (TOSC) (Gorbi and Regoli, 2003).	Mesure de la résistance cellulaire à différents oxyradicaux.	*Efficacité globale du système antioxydant	Relation non linéaire entre l'exposition aux polluants et le TOSC. Dissection de la glande digestive
Biomarqueurs de génotoxicité			
Élution alcaline de l'ADN (Koch et Giandomenico 1994; Bolognei et al. 2006)	Mesure de l'intégrité de l'ADN.	Grande sensibilité.	Variabilité et incohérence dues à la complexité technique.
Test de Comète (Mitchelmore et al. 1998)	Mesure de la cassure de l'ADN.	Sensible et utile pour la génotoxicité	*Non spécifique. *La méthode peut induire un minimum de bris d'ADN
Microméthode (Batel et al., 1999)	Mesure par picogreen du taux d'ADN double brin qui se déroule en conditions alcalines.	Quantitative	*Complexité et variation du test.
Test du micronucléus (Bolognosi et al 2004 ; Siu et al. 2004 ; Dailianis et al. 2003)	Mesure des dommages accumulés au cours de la vie cellulaire.	Semi-quantitative	*Mesure laborieuse par microscopie. *Ne correspond pas au gradient de pollution.
Biomarqueurs d'exposition à des polluants			
Métallothionéines	Mesure de l'homéostasie des métaux lourds	Corrélation entre le niveau de certains métaux lourds et leur accumulation	*Variabilité.
Activité cholinestérase (Baron et al. 1995 ; Valbonesi et al. 2003)	Dosage de l'activité cholinestérase des branchies.	Adoptée par des organismes européens de bio-surveillance des écosystèmes	*Peu sensible. *Certaines espèces (<i>Tapes philippinarum</i>) ont peu d'activité cholinestérase.
Mesure de « Multidrug Resistance ou multi-xenobiotic resistance » (MDR/MXR), (Luedeking et Koehler, 2004).	Induction ou inhibition de l'expression des gènes selon le type de polluant.	Réponse spécifique et rapide.	*Variabilité. *Difficulté d'interprétation des niveaux selon un temps d'exposition aigu vs chronique.
Biomarqueurs de fonctionnalité			
Adhésion des hémocytes (Auffret et Oubella, 1997)	Caractériser l'adhésion des hémocytes en réponse à un pathogène ou un polluant.	Simple et quantitative	*L'adhésion n'a pas été différenciée entre les granulocytes et les hyalinocytes. *Variabilité.
Phagocytose des hémocytes (Bilitewski 2008)	Évaluer la capacité des hémocytes à phagocyter des billes fluorescentes	Applicables à de nombreuses espèces.	*Variabilité. *Standardisation complexe

Au cours des deux dernières décennies, des approches utilisant une combinaison de biomarqueurs tel l'Index Immunotoxicologique a permis de combiner de cinq à sept paramètres afin de comparer plusieurs sites pollués (Auffret et al. 2004). Le degré de corrélation de chacun de ces paramètres avec le degré de pollution des sites était variable. Certains biomarqueurs étaient modulés à la hausse et d'autres modulés à la baisse, rendant l'utilisation d'un index encore

plus difficile lorsque le processus de réponse biologique n'est pas entièrement connu (Auffret et al. 2006).

Une façon de résoudre le problème de cette grande variabilité serait d'utiliser une approche multiomique qui permet de combiner plusieurs approches de métadonnées pour un même type de cellule. Par exemple, pour un même échantillon d'hémocytes, une analyse du génome, du transcriptome, du protéome peut être combinée au méthylome (Bock et al. 2016). En tenant compte d'un plus grand nombre de gènes qui s'expriment précocement ou tardivement suite à un stress, une « signature » de ces gènes démontrerait l'état de santé du bivalve. En y associant l'analyse du microbiote de la moule, cela permettrait l'identification des pathogènes de la moule et des bactéries inhérentes à son environnement qui ont été sélectionnées en fonction du type de polluant qu'on y retrouve (Thomas et al. 2014).

Les approches récentes faisant appel à du séquençage à haut débit d'acides nucléiques et au traitement informatisé de méga données ont permis d'identifier l'ensemble des gènes qui sont surexprimés ou sous-exprimés en lien avec l'état de santé de l'animal et de stressseurs environnementaux (Nguyen et al. 2020). D'autres approches telle la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire ou la spectroscopie de masse couplée à des techniques de chromatographie ont également menés à la caractérisation du métabolome, i.e. l'ensemble des métabolites produits au moment d'un prélèvement chez l'animal (Edison et al. 2016). Le même principe s'applique pour le protéome, le lipidome et le méthylome. Utilisées de façon de plus en plus courante en médecine, ces tests sont devenus plus accessibles et sont présentement en développement en écologie. Les nouvelles infrastructures et plateformes d'analyses peuvent maintenant permettre, une analyse de dizaines sinon centaines d'échantillons à la fois, ce qui diminue les coûts des analyses. De plus, l'intégration de ceux-ci permet de mettre à jour de nouveaux processus biologiques normaux ou pathologiques chez l'humain ou dans les modèles animaux (Ebrahim et al.2016, Golubnitschaja et al. 2018, Rappoport et al. 2018).

4. NOUVEAUX BIOMARQUEURS INSPIRÉS DE LA RECHERCHE MÉDICALE

Depuis le début de ma pratique médicale, les patients me demandent : « Docteur faites-moi passer une prise de sang afin que je sache si je suis en santé et m'assurer que je n'ai pas le cancer ». Il y a une trentaine d'années, il était utopique de penser à un tel concept. Aujourd'hui

les progrès accomplis dans le domaine de la médecine personnalisée nous rapprochent de cette quête peu invasive d'un bilan de santé.

Afin qu'un biomarqueur présente un intérêt, il doit être facilement prélevable, quantifiable et la fiabilité du test doit démontrer une bonne sensibilité et spécificité. Idéalement, il aura aussi un potentiel prédictif. Le développement au cours des dernières années du concept de biopsie liquide semble être une avenue intéressante répondant à ces critères. La biopsie liquide est simple et non-invasive; prélèvement de sang, de salive, d'urine ou autre liquide corporel. À la différence de la biopsie tissulaire traditionnelle invasive, la biopsie liquide repose sur l'analyse de l'ADN tumoral circulant (ctDNA) qui permet d'identifier les mutations somatiques inhérentes à la tumeur (Crowley et al. 2013). La sensibilité et la spécificité dépendent de la technique d'extraction utilisée. En combinant une approche multi-omique à la biopsie liquide, l'approche déjà élaborée chez l'humain pourra servir à l'évaluation de l'état de santé de la moule et de son milieu environnant.

4.1 La biopsie liquide

Une biopsie liquide consiste à prélever un liquide biologique, tel le sang ou autre liquide corporel et en faire l'analyse. La biopsie liquide telle que nous la connaissons aujourd'hui, possède l'avantage d'être techniquement facile à prélever, non-invasive et plus accessible que la biopsie tissulaire. Elle est principalement basée sur l'analyse des acides nucléiques circulants (Crowley et al. 2013). Elle permet de donner à un moment « instantané » l'ensemble des empreintes d'acides nucléiques de l'individu ou celles provenant du non-soi tels l'ADN viral ou bactérien.

4.1.1 Utilisation en médecine

La biopsie liquide est utilisée en oncologie pour le diagnostic, le pronostic ainsi que pour la détermination du traitement (Neumann et al.2018). Le développement de la détection des anomalies du ctDNA pour l'identification des mutations par séquençage de nouvelle génération est au cœur de la médecine personnalisée. À partir du plasma d'un individu, il est possible d'identifier la présence d'ADN tumoral, d'en connaître les différentes mutations, les résistances aux traitements associées à ces mutations et d'identifier le traitement chimiothérapeutique ou biologique approprié (Schrager et Tenenbaum 2014). En 2016, le premier test approuvé par la

Food and Drug Agency (FDA) pour une biopsie liquide permettait de détecter les mutations sur le gène codant pour «*epidermal growth factor receptor*» (EGFR) associées à une résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans le traitement de l'adénocarcinome à petites cellules du poumon (Kwapisz 2017). Particulièrement, ce test est concordant à la biopsie tissulaire (96.96%) et il a une spécificité de 100% (Veldore et al. 2018). L'utilisation croissante des analyses de ctDNA a donné lieu à l'analyse de d'autres formes d'ADN circulant, appelé *circulating cell free DNA* (ccfDNA). D'autres applications médicales, comme l'analyse du ccfDNA fœtal dans le sang maternel, ont ainsi été développées et sont maintenant utilisées pour le dépistage d'anomalies chromosomiques (Wong et Lo 2015). Dans le cas d'une transplantation d'un greffon, la présence élevée de ccfDNA du donneur dans le sang du receveur signifie un rejet (Tanaka et al. 2018). La quantité de ccfDNA peut également avoir une valeur pronostique dans le choc septique (Chornenky et al. 2019). En ce qui concerne l'augmentation de ccfDNA dans l'infarctus du myocarde et dans les pathologies du foie, les corrélations pour une valeur pronostique sont à leurs premiers balbutiements (Ammerlaan et al. 2019).

4.1.2 Origine du ccfDNA

La présence d'acides nucléiques libres dans le plasma est connue depuis 1948 (Mandel et Metais). Nous savons aujourd'hui que le ccfDNA, du moins chez l'humain, origine de la mort cellulaire apoptotique ou nécrotique des cellules hématopoïétiques et dans une moindre mesure, des cellules somatiques (Moss et al. 2018). Pour un individu en bonne santé, cela correspond au diagramme représenté à la **figure 6**. En centrifugeant le sang en ses deux composantes, le contenu en acides nucléiques de la couche cellulaire est constitué principalement du contenu nucléaire des cellules sanguines, de rare cellules endothéliales et possiblement tumorales selon le cas, ainsi que l'ARN messager des *tumor educated platelets* (Sol et al. 2017). Hormis le ccfDNA, la composante plasmatique est également constituée du *circulating tumor DNA* (ctDNA), du *circulating cell-free RNA* (ccfRNA) (Neumann et al. 2018) et l'ADN mitochondrial dont la proportion des fragments de *mtDNA/ccfDNA* total correspond à 0.14% (Zhang et al. 2016).

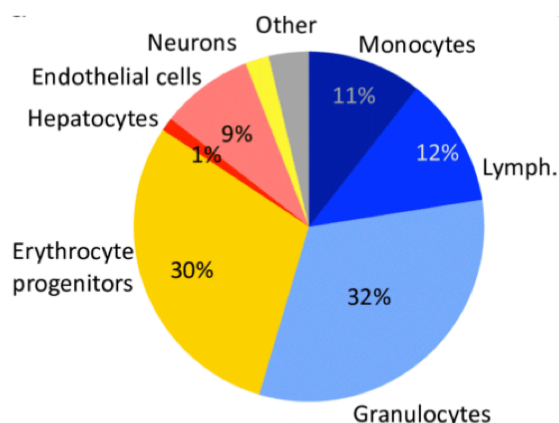


Figure 6. Répartition de l'origine cellulaire des fragments de *ccfDNA*.
(Selon Moss et al. 2018)

4.1.3 Caractéristiques (quantification et longueur)

La quantification des acides nucléiques a été rapportée pour la première fois chez des patients souffrants de Lupus Erythémateux Dissimulé (Tan et al, 1966). Ceux-ci avaient une quantité plus importante de *ccfDNA* que les patients en santé. Nous savons aujourd'hui que la longueur des fragments double brin d'ADN circulants se situe entre 100 à 160bp (Snyder et al., 2016), ce qui correspond à l'ADN qui est protégé par son lien autour des nucléosomes. La quantité moyenne de *ccfDNA* sanguin est de 30 ng/ml chez un humain en bonne santé et 180 ng/ml chez un patient atteint de cancer, pouvant augmenter jusqu'à plus de 1000 ng/ml chez certains cancéreux (Schwarzenbach et al., 2011). La demi-vie du *ccfDNA* peut varier de 15 minutes à plusieurs heures (Fleischhacker et Schmidt, 2007).

4.1.4 Non-soi

Bien que la majorité de l'ADN circulant origine du non-soi, il est maintenant connu qu'une partie du *ccfDNA* origine du non-soi. La présence de *ccfDNA* du non-soi a été démontrée en 1994 lorsqu'un phage M13 absorbé par le tractus intestinal de la souris, a été détecté par la suite dans le sang de l'animal (Schubbert et al. 1994). Des fragments d'ADN étrangers de longueur allant jusqu'à 1692 pb y étaient présents. La même démonstration a suivi avec le soya modifié génétiquement donné à des truites arc-en-ciel. Le promoteur 35S du virus du chou-fleur utilisé

pour induire la résistance au gluphosate était retrouvé dans les leucocytes sanguins chez les animaux testés par PCR (Chainark et al. 2008). Chez l'humain, grâce aux nouvelles techniques de séquençage, le groupe de Stephen Quake à Stanford a démontré la présence de ccfDNA du non-soi. Cette étude a notamment mis en évidence une grande diversité ainsi que de nouvelles souches bactériennes et virales (Kowarsky et al. 2017). En fait, les auteurs ont rapporté que 99% des fragments d'ADN circulant bactérien émanaient de souches inconnues jusqu'à maintenant. Or, le plasma qui était considéré jusqu'à tout récemment comme étant « stérile » n'est plus considéré comme un réservoir étanche depuis que la présence d'ADN circulant bactérien a pu être corroborée à des hémocultures positives des mêmes micro-organismes (Whittle et al. 2019). L'ADN du non-soi identifié chez l'humain comprend également l'ADN fœtal retrouvé dans le plasma de la mère (Fan et al. 2012). En fait, il existe maintenant des trousseaux commerciaux qui permettent d'analyser l'ADN circulant d'origine fœtale à des fins de diagnostic (Tsao et al. 2019). Il comprend également de l'ADN du donneur du greffon dans le plasma du receveur (Tanaka et al. 2018) ainsi que les fragments d'ADN des plantes consommées (Spisák et al. 2013). Le ccfDNA est devenu chez l'humain un biomarqueur qui permet non seulement d'évaluer la santé de l'individu, mais également d'analyser, du moins en partie, son interaction avec les facteurs environnementaux.

4.2 L'approche multi-omique

Le terme « génome » provient du botaniste allemand Hans Winkler en 1920 qui a combiné le nom « gène » et « chromosome » (Cristescu 2019) tandis que le terme « génomique » a été utilisé pour la première fois par Tom Roderick, un généticien, lors d'une rencontre informelle des trois « B » en 1986, dans le contexte du début de la cartographie du génome humain (Kuska 1998). Depuis le projet de séquençage du premier génome humain parrainé par le NIH dans les années quatre-vingt-dix, la diminution des coûts et l'efficacité des méthodes de séquençage à haut débit de nouvelle génération (*Next Generation Sequencing*, NGS) ont rendu disponible cette technologie à l'ensemble de la communauté scientifique (Wetterstrand 2013). En utilisant une extraction ciblée à un acide nucléique et une librairie combinée au NGS, l'analyse obtenue des fragments d'ADN donnera le génome, d'ARNm, le transcriptome, d'ADN méthylé, le méthylome, etc. Ainsi, la génomique représente l'étude de la fonction et la structure du génome entier. Par exemple, elle peut servir à identifier les gènes responsables d'une maladie complexe en analysant le génome d'un ensemble d'individus atteints d'une maladie (Hasin et al. 2017). La

transcriptomie permet notamment de distinguer les gènes exprimés sous certaines conditions et de mieux comprendre les processus de pathophysiologie sous-jacents. En analysant 80 666 transcriptomes cellulaires provenant de six types différents de cellules du cerveau de 48 patients atteints et non atteints de la maladie d'Alzheimer, il a ainsi été possible de démontrer qu'une différence du mécanisme de pathophysiologie est liée au sexe de l'individu (Mathys et al. 2019). De plus, la perturbation de l'expression des gènes est spécifique à certains types de cellules atteintes précocement dans le processus.

Inspirée par les progrès au niveau des acides nucléiques, les avancées dans les technologies à haut-débit d'identification des protéines et des métabolites ont permis d'étendre le concept « omique » au protéome (l'ensemble des protéines exprimées) et au métabolome (l'ensemble des petites molécules intermédiaires ou produit final d'un métabolisme). Par exemple, l'étude du métabolome chez des femmes enceintes souffrant de pré-éclampsie et/ou prématurité a permis d'identifier des biomarqueurs importants (Ghaemi et al. 2018). En y combinant les données phénotypiques, les dosages immunologiques ainsi que le microbiome, l'intégration de toutes ces données a mené à l'élaboration d'un algorithme du niveau de risque chez la femme enceinte. Dans cet exemple-ci, la présence de certaines bactéries (*Neisseria*) de la flore orale ainsi que la quantité de bactéroïdes intestinaux ont joué un rôle de biomarqueur prédictif de pré-éclampsie. Nous sommes au tout début du processus de compréhension du rôle physiologique et pathophysiologique des bactéries chez certaines espèces ou dans certains milieux environnementaux en tant que biomarqueur.

Dans la plupart des études, l'analyse du microbiome se fait par séquençage à haut débit et analyse d'amplicons générés par l'amplification des régions variables V2 à V4 du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (Klindworth et al. 2013). Alternativement, la diversité des taxons bactériens peut être obtenue par le séquençage à haut débit de l'ARN (RNA-Seq) (Bashiardes et al., 2016). Dans le domaine biomédical, l'analyse de microbiomes a permis, par exemple, d'observer que les patients souffrant de diabète et de pancréatite chronique ont un changement de la biodiversité de leur flore intestinale en plus d'avoir une surreprésentation de certaines bactéries (dysbiose) comparé à des individus non diabétiques (Jandhyala et al., 2017). En écologie environnementale, l'analyse du microbiome est un domaine de recherche en pleine émergence. En écologie marine, il a ainsi été possible de démontrer la présence de dysbioses lors d'un déversement d'huile brute tel l'incident sur la plateforme Deepwater Horizon. Les chercheurs ont pu mettre en évidence un changement important de la composition du microbiome

de l'eau de surface, ainsi que celui des tissus d'huîtres au profit de bactéries dégradant les hydrocarbures (Thomas et al., 2014).

Contrairement à l'étude du microbiome qui repose fréquemment sur l'analyse du gène de l'ARNr 16S, l'étude du virome est basée sur la reconnaissance de séquences nucléotidiques conservées d'origine virale qui varient selon les familles de virus puisqu'il n'existe pas de séquences virales universelles. La diversité du virome doit donc être dérivée du séquençage à haut débit d'acides nucléiques suivie d'analyses bioinformatiques ciblées. Le développement d'outils bioinformatiques, comme VIROME, VirFinder, PhiSpy, Phage_Finder, et autres, permet d'en faciliter l'analyse et d'apprécier la richesse du virome dans un environnement spécifique. Dans l'océan, par exemple, le virome marin est évalué à 10^6 - 10^8 particules virales par ml d'eau de mer (Suttle 2005). La proportion de bactéries:virus est de 1:5 à 1:10 (Suttle et al. 2007). La composition du virome des océans est similaire selon les quatre océans étudiés; la diversité virale varie selon la profondeur et la distance de la côte des sites d'échantillonnage (Paez-Espino et al. 2016). Nous commençons à comprendre le lien entre le virome et son environnement et aller au-delà de la simple attribution du rôle pathogène des virus. Ainsi, certains virus cyanophages des *Prochlorococcus* ont incorporé dans leur génome les gènes de la photosynthèse, et ceux du métabolisme de l'azote et du phosphate de façon à tromper la bactérie hôte qui continue la photosynthèse et la production d'énergie malgré l'infection virale (Brum et al. 2015). Les cyanophages en association avec la cyanobactérie *Synechococcus* seraient responsables à eux-seuls de la synthèse du quart de la production de la photosynthèse marine (Rohwer et Vega Thurber 2009). Des études intégrant des métadonnées seront nécessaires afin de comprendre le rôle et le lien virome-microbiome-hôte dans un contexte écologique marin. L'intégration des métadonnées demeure toutefois une tâche délicate puisqu'elle implique l'intégration de données disparates et la compréhension de leur interprétation (Ebrahim et al. 2016). La différence des volumes de données, l'effet de lot (jours différents, technicien différent) et la modularité peuvent induire des biais dans l'interprétation des résultats, malgré des processus de normalisation (Leek et al. 2010). Il faut surtout tenir compte que l'écosystème étudié est en constante évolution d'où l'importance de prélever les données biotiques, abiotiques et les échantillonnages périodiquement (Muller-Karger et al. 2018). Ceci permet d'établir une « signature de base ». Par exemple, en étudiant une barrière de corail, où les bactéries qui y sont présentes en symbiose sont identifiées, le transcriptome et le métabolome de base sont connus, en partant de cette « signature », tout changement dans les données biotiques et abiotiques permettra d'identifier les facteurs responsables advenant un blanchiment des coraux (Gosh et al. 2017). Ultiment, les

objectifs de telles études « multi-omiques » seront de détecter les changements menaçant les écosystèmes à l'aide de biomarqueurs et de pouvoir intervenir précocement afin de préserver les milieux aquatiques marins.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Mise en contexte

Les activités anthropogéniques affectent les écosystèmes marins, particulièrement en régions polaires, notamment à Kerguelen, un milieu subantarctique reconnu comme étant très sensible aux changements climatiques (CC). L'étude de deux types de moules sentinelles présentes à Kerguelen, *Aulacomya atra* et *Mytilus edulis desolationis*, permet d'en évaluer l'impact et de mieux comprendre certains aspects des mécanismes d'adaptation. Les moules sont des animaux filtrants qui possèdent de nombreux avantages comme espèces sentinelles: elles sont sessiles, à vaste distribution géographique, ayant des capacités de bioaccumulation des polluants et métaux lourds. Elles sont au centre de divers programmes d'observation visant à mesurer l'état de santé des écosystèmes marins, comme le programme américain *Mussel Watch*. Les biomarqueurs conventionnels utilisés jusqu'à maintenant pour évaluer l'état de santé des moules requièrent des prélèvements tissulaires sur place et une logistique de transport complexe. Ces approches compliquent considérablement leur utilisation en régions éloignées, comme l'Arctique et l'Antarctique d'où la nécessité de développer de nouvelles approches de prélèvement ainsi que de nouveaux biomarqueurs qui y correspondent.

But de l'étude

Faire une étude comparative de l'état de santé de *A. atra* et *M. desolationis* et de leurs mécanismes d'adaptation aux CC.

Hypothèse

Les moules peuvent être utilisées comme espèce sentinelle pour étudier l'effet des CC et la pollution sur l'état de santé des écosystèmes marins côtiers en utilisant des biomarqueurs moléculaires.

Objectifs spécifiques

1. Comparer la réponse hémostatique entre les deux espèces face aux polluants et au stress de température
2. Améliorer les connaissances du « partage immunitaire » entre les moules

3. Développer une nouvelle plateforme d'échantillonnage logistiquement simple et compatible aux approches multi-omiques.
4. Développer des approches multi-omiques adaptées au concept de biospie liquide.

CHAPITRE II.

5. ÉTUDE COMPARATIVE DE LA RÉPONSE HÉMOCYTAIRE ENTRE LES DEUX ESPÈCES DE MOULES DE KERGUELEN, MYTILUS EDULIS DESOLATIONIS ET AULACOMYA ATRA

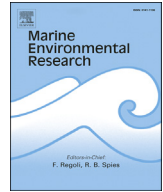
"Comparative analysis of hemocyte properties from *Mytilus edulis desolationis* and *Aulacomya ater* in the Kerguelen Islands." *Marine environmental research* 110 (2015): 174-182.

RÉSUMÉ

La capacité des bivalves à répondre à des stress environnementaux dépend de leur immunité cellulaire. Ainsi, un changement des conditions de l'habitat suite à un stress thermique ou à des polluants peut nuire à des espèces sensibles et moduler la biodiversité d'un écosystème en avantageant certaines espèces plus tolérantes. Dans cette optique, nous avons comparé la sensibilité des hémocytes de *M. edulis desolationis* et de *A. atra* au stress thermique et à l'exposition au cadmium. Les deux espèces partagent fréquemment la même moulière dans l'archipel subantarctique de Kerguelen. Les résultats démontrent une activité phagocytaire et une viabilité identique des hémocytes des deux espèces suite à l'exposition de différentes concentrations de cadmium. Cependant leur profil apoptotique mesuré à l'aide d'un cytomètre en flux et les marqueurs Annexin V et YO-PRO-1 est très différent. De plus, le compte hémocytaire d'*A. atra* suite à un stress thermique, diminue significativement tandis que celui de *M. edulis desolationis* ne change pas. Cette réponse différentielle soulève l'hypothèse que la diversité des moulières mixtes risque de changer suite à une exposition à des polluants ou à un changement de température.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Yves St-Pierre et Stéphane Betoulle et moi avons conceptualisé le plan expérimental, procédé à l'échantillonnage et réalisé l'ensemble des expériences qui se sont déroulées à Kerguelen. J'ai fait les analyses informatiques et les figures. L'interprétation des résultats et la révision de l'article est partagée entre Yves St-Pierre, Stéphane Betoulle et moi. Stéphane Betoulle, Michel Auffret, Pauline Brousseau et Michel Fournier ont fait les demandes de financements et organisé la logistique pour le déroulement des travaux à Kerguelen. Tous les auteurs ont participé à l'écriture et à la révision du manuscrit.



Comparative analysis of hemocyte properties from *Mytilus edulis desolationis* and *Aulacomya ater* in the Kerguelen Islands



France Caza^a, Stéphane Betoulle^b, Michel Auffret^c, Pauline Brousseau^a,
Michel Fournier^a, Yves St-Pierre^{a,*}

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

^b Université Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 SEBIO Stress environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques, Campus Moulin de la Housse, 51687 Reims, France

^c Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR CNRS 6539-LEMAR, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzane, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2015

Received in revised form

31 August 2015

Accepted 1 September 2015

Available online 4 September 2015

Keywords:

Hemocytes

Kerguelen

Phagocytosis

Apoptosis

Cadmium

Flow cytometry

ABSTRACT

The capability of bivalve molluscs to respond to environmental stresses largely depends upon their cellular immunity. Accordingly, shift in habitat conditions following thermal stress or exposure to pollutants may harm sensitive species differently, thereby modulating the biodiversity of a given ecosystem by favoring stress-tolerant species. Here, we have compared the sensitivity of hemocytes from *Mytilus edulis desolationis* (*M. edulis desolationis*) and *Aulacomya ater* (*A. ater*) to acute thermal stress and exposure to cadmium. The two subantarctic species are commonly found in the same habitat in the isolated Kerguelen archipelago. Our results showed that the phagocytic activity and viability of hemocytes from both species were equally sensitive to increasing concentrations of cadmium. However, although *in vitro* exposure to cadmium induced apoptosis in hemocytes of *M. edulis desolationis* and *A. ater*, flow cytometric analyses showed that the apoptotic profile of both species differed greatly when using Annexin V and YO-PRO-1 as apoptotic markers. We also found that the total hemocyte counts decreased strongly in *A. ater* but not in *M. edulis desolationis* following an acute thermal stress. Taken together, these results showed that stress responses differed significantly in hemocytes from both species. This suggests that the co-existence of both species may be at risk following exposure to pollutants and/or changes in temperature.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Stable co-existence of two or more similar species usually depends on resource availability or predation and other intrinsic factors, such as growth rate, recruitment intensity, and fecundity. Disturbance by climatic changes or pollutants are two additional factors that affect coexistence of multiple species. This is particularly true in marine littoral ecosystems where thermal stress has a profound influence on biogeographic and local-scale distribution patterns of many sessile species, including mussels (Stachowicz et al., 2002; Braby and Somero, 2006a; Schneider and Helmuth,

2007; Jones et al., 2009; Jones et al., 2010). For example, previous studies have reported that some mussel species are more tolerant to thermal stress than others (Braby and Somero, 2006a, 2006b; Lockwood and Somero, 2010; Fields et al., 2012). Co-existence and diversity of mussel populations can also be affected by habitat disturbances caused by exposure to toxic metals and pollutants (Goldberg and Bertine, 2000). In all cases, the tolerance will depend on the distinct capacities of the species to cope with cellular-level damage induced by such environmental stress. This is particularly true for hemocytes. Their number, viability, and functions are all impaired following exposure to thermal stress or toxic metals or pollutants, including cadmium (Coles et al., 1995; Pipe et al., 1999; Sokolova et al., 2004; Brousseau and Fournier, 2013). Because hemocytes are the first line of internal defense against infections and non-self particles and play an important role in disease prevention, they form an integral part of the survival strategy of mussels. Furthermore, these cells are involved in many physiological functions of mollusk such as nutrition and

Abbreviations: *A. ater*, *Aulacomya ater*; *M. edulis desolationis*, *Mytilus edulis desolationis*; PI, propidium iodide; SSC, side scatter; FSC, forward scatter.

* Corresponding author. INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada.

E-mail address: yves.st-pierre@iaf.inrs.ca (Y. St-Pierre).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.09.003>

0141-1136/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

biomineralisation (Pollero et al., 1985; Donaghy et al., 2009). Not surprisingly, measure of their functional integrity is often used as a biomarker to assess the toxicity of environmental contaminants and their impact on the mollusk health status in a given ecosystem (Gagné et al., 2008). In the present work, we have compared the sensitivity of hemocytes from *Mytilus edulis desolationis* (*M. edulis desolationis*) and *Aulacomya ater* (*A. ater*) to acute thermal stress and exposure to cadmium. The two subantarctic species are commonly found in the same habitat in the isolated Kerguelen archipelago. Because of its strategically geographical position, the archipelago is considered an important site to investigate the effects of global change on regional marine ecosystems (Lebouvier et al., 2011). In the present study, cellular immune parameters were compared in both species and stress responses following

experimental exposure to pollutants and/or changes in temperature were examined. Overall, our findings suggest that albeit hemocytes from both species share some common cellular and functional characteristics, they also exhibit important differences that may eventually impact the delicate balance that sustains the co-existence of these two species.

2. Results

2.1. Flow cytometric scattering profiles and phagocytic activity of hemocytes

Flow cytometry has become the technology of choice to measure the vital functions and viability of hemocytes of bivalves. Basic

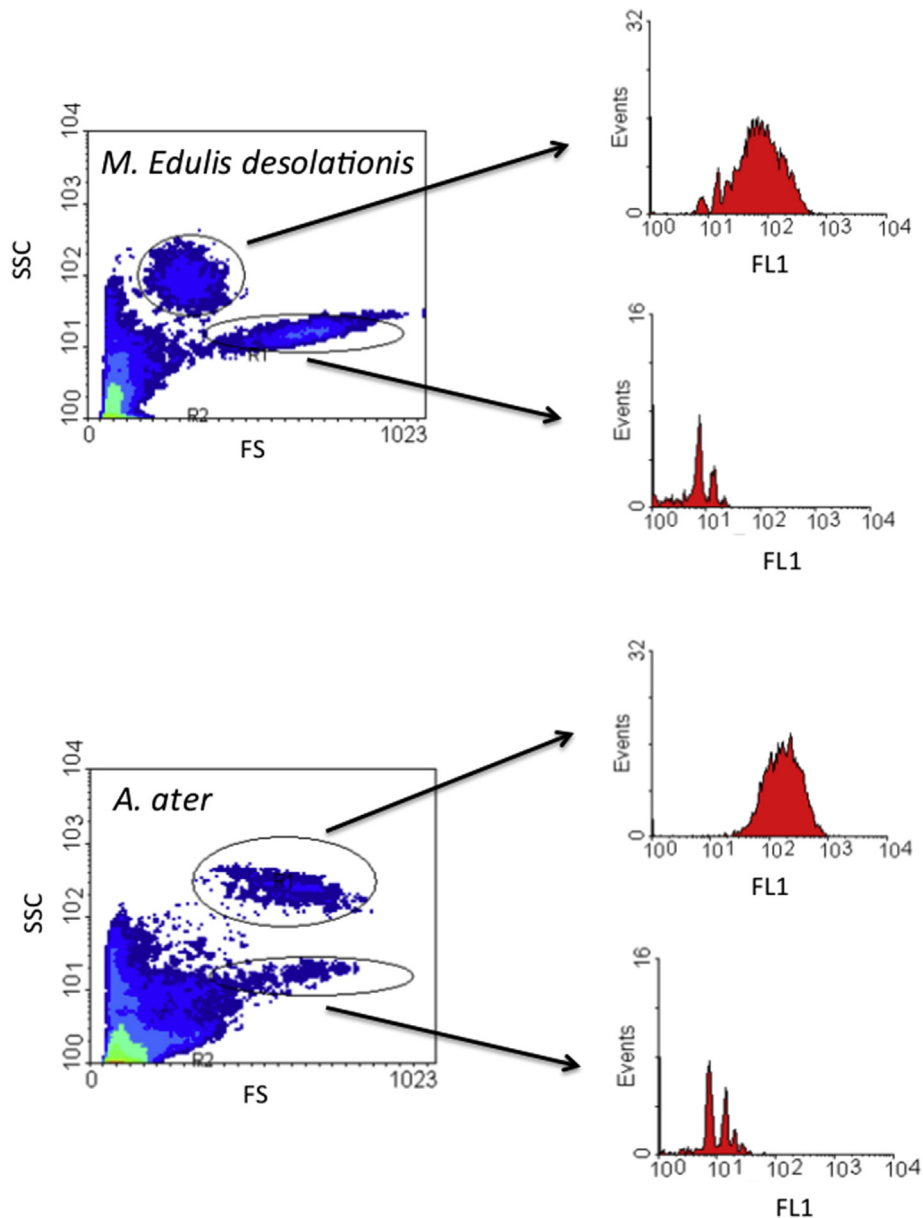


Fig. 1. Flow cytometric analysis of hemocyte populations. Left histograms, representative flow-cytometry scatter plot of hemocytes collected from *M. edulis desolationis* and *A. ater*. The forward scatter (FS) is an approximative measurement of mostly diffracted light in the direction of the laser's path, or forward direction. The intensity of this signal is proportional to cell size and is reported on a linear scale. The side scatter (SC) signal is collected following diffraction at 90° and its intensity is proportional to cell granularity, reflecting the optical homogeneity of a given cell population. Granulocytes appears at the higher end of the SSC scale while agranular hyalinocytes will appear at the lower end of the SSC. Combining FSC and SSC thus allows researchers to measure multiple subpopulations of cells from their samples. On the right, phagocytosis of hemocytes subpopulations. The horizontal axis of the histogram represents the signal intensity of fluorescence (FL1) and the vertical axis represents the number of events with a given fluorescent intensity. The results are representative of at least ten independent experiments.

hematological parameters, such as hemocyte subpopulation ratio, can be established on such subpopulations on such properties as size and granularity, as obtained from the scattering profiles. Such flow cytometric profiles, as well as other methods, have shown that hemocytes are traditionally divided in two main morphotypes, the granulocytes and the hyalinocytes (agranulocytes) (Carajaville et al., 1995; Carballal et al., 1997). These populations are functionally distinct; the granulocytes harbors an important phagocytic activity whereas the hyalinocytes do not. Because of their cytoplasmic granules, granulocytes have higher side scattering profiles than hyalinocytes and are capable of phagocytic activity, as shown by their ability to phagocyte fluorescent (FL1) beads (Sun et al., 2010; Donaghy and Volety, 2011). These two populations are readily distinguishable in *M. edulis desolationis* (Fig. 1). Although we found that hemocytes from *A. ater* had distinct scattering intensity signals, it was also possible to clearly distinguish both granulocytes and hyalinocytes subpopulations. The *in vitro* phagocytic activity of resting granulocytes collected from in *M. edulis desolationis* and *A. ater* were also comparable in terms of percentage of phagocytic cells and the number of phagocytosed beads per hemocyte (Fig. 2). Because hemocytes cellular functions, including phagocytosis, have been shown to be sensitive to salinity conditions and temperature variations (Parry and Pipe, 2004; Mosca et al., 2013), and given the wide variety of salinity conditions found in the Kerguelen Islands (Blot et al., 1989), we have also tested the phagocytic function of hemocytes from both species in different conditions. For this purpose hemocytes were challenged with fluorescent beads *in vitro* and incubated for 16 h at different temperatures (4 °C, 8 °C, 18 °C, and 31 °C) (Fig. 2b) or salinity conditions (Fig. 3). Our results showed that the temperature and salinity profiles of *in vitro*

phagocytosis were similar for both mussels species, even when salinity conditions and temperatures were combined (Fig. 3b).

2.2. Effect of cadmium on phagocytic activity of hemocytes

Hemocytes play a critical role in the defense of bivalves against neoplastic disorders caused by exposure to pollutants. Unfortunately, pollutants themselves can suppress the function of hemocytes. This has been particularly well documented in the case of cadmium, which can suppress the phagocytic activity of hemocytes from various species of mussels, including *M. edulis* (Brousseau et al., 1999; Sauvé et al., 2002); this contaminant has even become a “reference toxicant” for *in vitro* standardized immunotoxic assays in this species (Rault et al., 2013). Because hemocyte-mediated phagocytosis is a critical component of the mussel defense system, we have compared the phagocytic activity of hemocytes from both *M. edulis desolationis* and *A. ater* following *in vitro* exposure to increasing concentrations of cadmium. To minimize a possible bias by allometrics, phagocytosis were measured in hemocytes collected from mussels with similar body mass and shell length. Our results showed that hemocytes from both species were equally sensitive to cadmium-induced suppression of phagocytosis at concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-3} M (Fig. 4). This effect was likely caused by its cellular toxicity since cadmium and other heavy metals are well known to exert severe toxic effects on various cell types, including cells of the immune system (Bernier et al., 1995; Fortier et al., 2008). We indeed found a significant dose-dependent increase in dead cells following exposure of hemocytes to increasing concentrations of cadmium (Fig. 5).

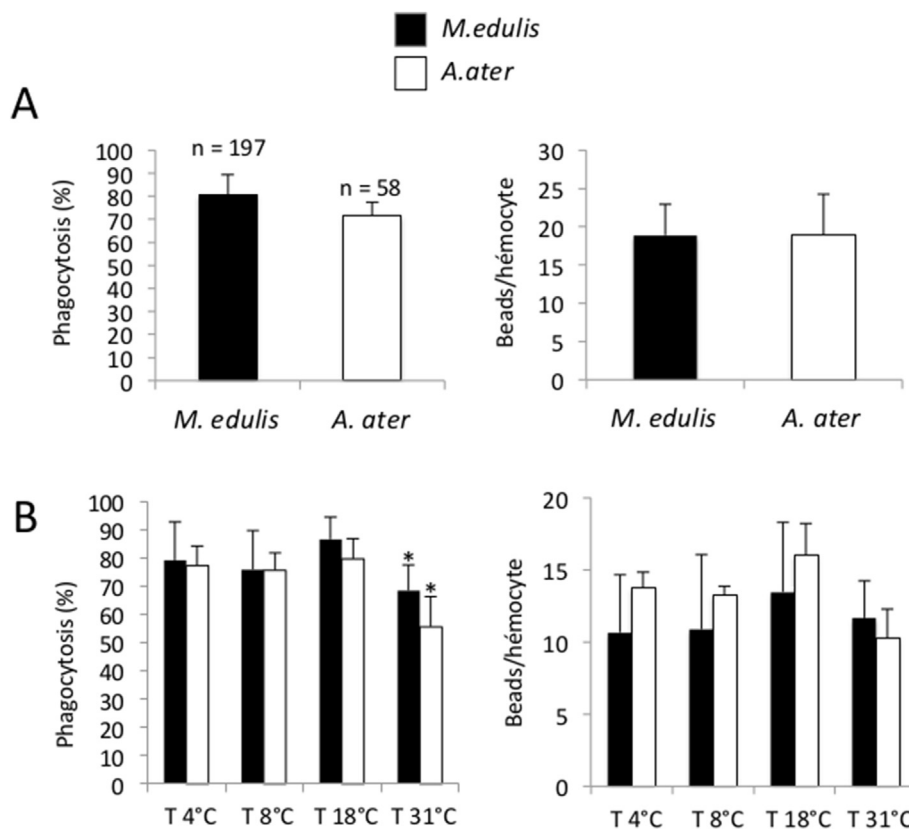


Fig. 2. Phagocytic activity of hemocytes. (A) Constitutive phagocytosis (measured at 18 °C following 16 h of incubation in the dark). (B) Effect of temperature on phagocytosis. In some experiments, hemocytes were challenged as above for 18 h in the dark at the indicated temperatures (4 °C, 8 °C, 18 °C, and 31 °C). *p < 0.05. The results are representative of at least three independent experiments.

2.3. Cadmium-induced apoptosis

In humans, the toxicity of cadmium has been linked to its ability to induce apoptosis in several cell types, including lymphocytes (Shenker et al., 1997; Kondoh et al., 2002; Mao et al., 2007). A similar scenario has been observed in hemocytes from other biological species, and collected from the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*, from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, or from the shrimp, *Penaeus monodon* (Sokolova et al., 2004). To determine whether hemocytes from *M. edulis desolationis* and *A. ater* responded equally to cadmium-induced apoptosis, we first used the YO-PRO-1 dye, which is only taken up by apoptotic cells and excluded from viable cells (Idziorek et al., 1995; Plantin-Carrenard et al., 2003). Hemocytes were collected from mussels and challenged *in vitro* with increasing concentrations of cadmium for 16 h at 18 °C in the dark. After this period, two-color flow cytometric analysis was carried out to measure uptake of YO-PRO-1 and PI, a membrane impermeant dye which is excluded from viable cells and commonly used for identifying dead cells in a mixed population. Our initial experiments using hemocytes from *M. edulis desolationis* showed a dose-response effect of cadmium on the uptake of YO-PRO-1 (Supplementary figure S1). However, while we found that cadmium induced a dose-dependent uptake of YO-PRO-1 dye in hemocytes of *M. edulis desolationis*, no such uptake occurred in hemocytes from *A. ater* in the same experimental conditions (Fig. 6). We tested whether such difference was observed using Annexin V staining, another commonly used apoptotic marker. Our results with hemocytes from *M. edulis desolationis* confirmed that cadmium induced a dose-dependent increase of Annexin V-positive, PI-negative (apoptotic) cells (Supplementary figure S2). When we compared the percentage of Annexin V-positive, PI-negative (apoptotic) cells in hemocyte suspensions from *M. edulis desolationis* and *A. ater*, we found that in this case, hemocytes from *A. ater* were preferentially stained with Annexin V (Fig. 7). These observations suggest that hemocytes from both species were both sensitive to the toxicity of cadmium. Their distinct response to markers of apoptosis suggest, however, that they differ in terms of molecular mechanisms that leads to cell death upon exposure to cadmium.

2.4. Response of hemocytes to a short term acute thermal stress

Because acute changes in temperature have significant effects on homeostasis of hemocyte cell number (Yao and Somero, 2012), we next compared the sensitivity of both mussel types to acute stress response. For this purpose, we used a short term (1 h) acute thermal stress during which mussels were completely immersed in water at 30 °C, a condition previously used by others to study the effect of acute thermal stress on hemocyte functions between mussels congeners (Farcy et al., 2007; Yao and Somero, 2012). No death in both mussel species was observed in these conditions (*data not shown*), consistent with previous studies using *M. edulis* (Yao and Somero, 2012). Our results showed that while hemocytes counts from *M. edulis desolationis* exposed to an acute thermal stress did not vary, those of *A. ater* were significantly reduced (Fig. 8). Flow cytometric analyses of the scattering profiles of hemocytes and PI uptake after this short acute thermal stress showed that such depletion affected equally both granulocyte and hyalinocyte populations. Interestingly, measurements of PI-uptake by hemocytes collected from mussels undergoing thermal stress was comparable to those collected from control mussels, indicating that such acute thermal stress does not affect the viability of hemocytes (Supplementary figure S3).

3. Discussion

The ability to mount cellular defense response to maintain organism homeostasis under environmental disturbances is crucial for survival. Here, we report that two species of mussels that often cohabit in the same subantarctic marine microenvironment have distinct sensitivity to environmental stresses. More specifically, we found that while hemocytes from both species had similar phagocytic activity, they responded differently to cadmium-induced apoptosis and to acute thermal stress. These results show that changes in environmental conditions may have distinct effect on the immune status of different molluscan species and may alter the delicate balance that sustains the existence in the same habitat of mixed populations of bivalve molluscs.

To our knowledge, this is the first report that directly compares the sensitivity of these two subantarctic bivalves species to environmental stresses. This is also the first study that specifically examines hemocyte functions in *A. ater*. In fact, there are very few published reports on *A. ater*. Our flow cytometric analyses showed that hemocyte populations of *A. ater* had a similar composition as found in other species, with a clear distinction between granulocytes and hyalinocytes. The phagocytic activity and percentage of phagocytic cells were also similar to that of *M. edulis desolationis*, even in presence of cadmium. The inhibitory doses of cadmium were similar to those previously reported for those collected in the Northern Hemisphere (Rault et al., 2013). However, our results suggest that *A. ater* responded differently to the pro-apoptotic effect of cadmium when compared to *M. edulis desolationis*. While we

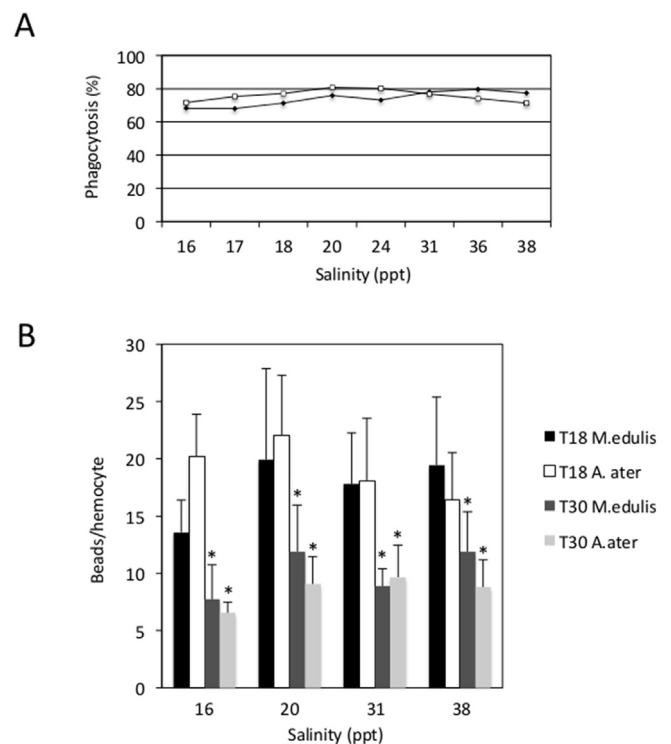


Fig. 3. : Effect of salinity on phagocytosis. (A) Percentage of phagocytic cells of hemocytes collected from *M. desolationis* and *A. ater* after overnight incubation (18 h) in the dark at different salinity. In situ salinity is approximately 31–34 ppt found at Port-aux-Français where mussels were collected (Blot et al., 1989; *data not shown*). (B) Combined effect of salinity and temperature (at 18 °C and 30 °C) on the number phagocytosed beads per hemocyte collected from *M. desolationis* and *A. ater*. Statistical significance between measures at 18 °C and 30 °C for each conditions and each species are shown. **p* < 0.05. The results are representative of at least three independent experiments.

indeed found that hemocytes from both species were equally sensitive to cell death induced by cadmium (as shown by the uptake of PI), the use of membrane-specific apoptotic markers, such as YO-PRO-1 and Annexin V, showed that their membrane behaved differently to cadmium-induced apoptosis. The results with Annexin V, for instance, suggest that hemocytes from *A. ater* may be more sensitive to loss of plasma membrane asymmetry. When combined with a live/dead dye such as propidium iodide, Annexin V staining is used to detect « flipping » of phosphatidyl serine to the outer surface of the membrane at the early stages of apoptosis before the loss of membrane integrity in a non perturbing manner and without the need to penetrate the cell (Vermees et al., 1995). YO-PRO-1 staining, on the other hand, is a nuclear dye that penetrates inside permeant apoptotic cells following loss of membrane integrity. This dye is routinely used to measure membrane permeabilization (Rokic and Stojilkovic, 2013) and is an effective biomarker of apoptosis when used together with PI

(Idziorek et al., 1995; Plantin-Carrenard et al., 2013). The use of these dyes thus allow to capture profound changes occurring in the structure of cell membrane and serve as a signal for recognition and elimination of dead cells (Ravichandran, 2010). Whether the difference in YO-PRO-1/Annexin V staining following exposure to cadmium is due to different membrane composition or intrinsic differences in the apoptosis pathway between both mussel species awaits further investigations, most notably at the molecular level on the multixenobiotic resistance system, which dictates the intracellular accumulation of extracellular molecules (Minier et al., 2002). Moreover, while there has been considerable progress in our knowledge of apoptotic pathways of *M. edulis* (Terahara and Takahashi, 2008; Romero et al., 2011), there is yet no information on the molecular mediators of apoptosis in *A. ater*. We are currently investigating this issue. It is important to remember, however, that we used experimental conditions based on an *in vitro* assay using an 18 h incubation period. This approach has been used by many

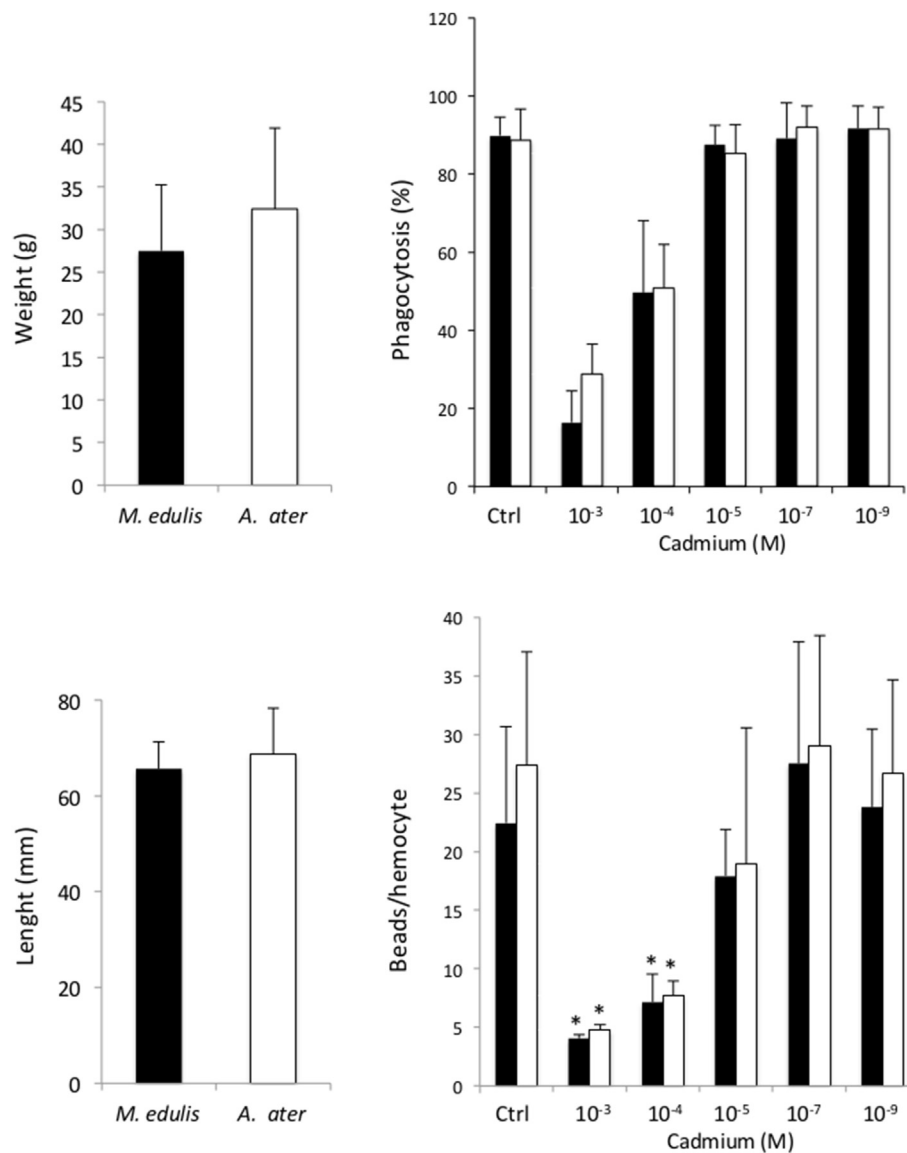


Fig. 4. Phagocytosis following exposure to cadmium. Hemocytes were collected from both species of mussels with similar allometrics (length and body weight, left histograms) and incubated with fluorescent latex beads at 18 °C in absence (Ctrl) or presence of increasing concentrations of cadmium (from 10⁻⁹ M to 10⁻³ M). After 16 h, hemocytes were harvested and the percentage of phagocytic cells (upper right) and the number of beads per hemocytes (lower right) were measured by flow cytometry. Statistical significance with control (absence of cadmium) are shown. *p < 0.05. The results are representative of at least three independent experiments.

investigators in the past to measure the effect of pollutants on cellular toxicity of hemocytes collected from mussels (see, for example, Sauvé et al., 2002 and Rault et al., 2013). Whether hemocytes from both species have distinct kinetics of response remains to be tested. We cannot also rule out that long *in vitro* incubation periods may positively or negatively select for minor subpopulations of hemocytes. A detailed characterization of hemocytes subpopulations using specific biomarkers will help to address such possibility.

Another difference that seems to distinguish *A. ater* and *M. edulis desolationis* is their response to a short term acute thermal stress. Thermal tolerance plays an important role in the survival and growth of mussels in rocky intertidal habitats where temperatures varies widely due to alternating exposure to the aquatic and aerial environments (i.e., high and low tides, respectively). The tolerance of *M. edulis desolationis* to acute thermal stress is consistent with previous studies showing that *M. edulis* is a warm-adapted species relative to its congeners (Yao et al., 2013). Such difference might reflect evolution history which is believed to impact on the ability of a given species to sustain heart function in the cold (Braby and Somero, 2006b; Fields et al., 2012). The effect of the acute thermal stress on hemostasis of *A. ater* raises a number of questions. The thermal stress did not induce any detectable increase in cell death or decrease in their phagocytic functions, suggesting that heat stress possibly affected the tissue distribution of hemocytes of *A. ater* rather than their viability and cellular functions. Alternatively, our results may reflect distinct molecular pathways, as suggested by recent observations comparing heat tolerance of *Mytilus galloprovincialis* to *Mytilus californianus* or *Mytilus trossulus* (Tomanek and Zuzow, 2010; Lockwood et al., 2010; Yao and Somero, 2012; Yao et al., 2013). Other studies have also shown that distinct heat tolerance in *M. galloprovincialis* and in *M. californianus*, pro- and active caspase-3 expression increased rapidly (30 min) following similar acute thermal stresses (cold or heat) (Yao and Somero, 2012). This would suggest that hemocytes from *A. ater*, but not from *M. edulis desolationis*, undergo changes at the molecular level when subjected to such acute thermal stress. This further emphasizes the need to better characterize, at the molecular level, the genes and molecular pathways involved in cell survival and apoptosis in *A. ater*. It will also be important to repeat these experiments using a range of temperatures to better compare

the thermal tolerance for both species. Such information might not only gives us clues regarding that different responses between *M. edulis desolationis* and *A. ater* following environmental stresses, but might be useful for the development of biomarkers that could be useful to better monitor changes occurring in fragile habitats found in specific marine coastal environment.

A. ater and *M. edulis desolationis* are often found in the same marine habitat in the Kerguelen Islands (Supplementary figure S4), even though *A. ater* is usually found in deeper marine habitats. While we found that *M. edulis desolationis* is normally the dominant species in most mussel beds in the Kerguelen archipelago, we found that some mussel beds, such as one found at tide depth at Port-aux-Français, is largely dominated by *A. ater*. Whether such dominance results from distinct sensitivity to local environmental stress is an interesting hypothesis.

4. Materiel and methods

4.1. Mussels and hemolymph collection

Adult specimens (55–70 mm length) of blue mussels, *M. edulis desolationis*, and ribbed mussels, *A. ater* were collected on the intertidal rocky shore of Port-aux-Français (Kerguelen Islands, France). Mussels were immediately transferred to the marine laboratory of Port-aux-Français and placed in a temperature-controlled (12 °C) aerated aquarium containing filtered recirculating seawater maintained on a 12 h:12 h light/dark cycle. The animals were maintained in these conditions for at least one week before use. For each experiment, individuals shell lengths and weight were measured. After breaching the shell with the tip of a knife, hemolymph was withdrawn from the adductor muscle using 5 mL syringes fitted with 25 gauge needles. Hemocyte concentrations and viability were determined by the use of trypan blue exclusion using a haemocytometer. Samples were immediately divided into aliquots and diluted in different solutions, as described below. In all cases, hemolymph was collected from single individuals, without pooling and centrifugation.

4.2. Phagocytosis

Phagocytosis was carried out as described by Brousseau et al., 1999. Briefly, hemocyte suspensions (5×10^5 cells) were distributed in round-bottomed 96-well plates. Yellow-green latex FluoSpheres (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA; diameter 1.2 μm) were then added to each well at a hemocyte: bead ratio of 1:100. Unless otherwise indicated, all experiments were carried out at 18 °C in the dark. After 18 h, the supernatant was removed by gently flickering and the plates tapped dry on absorbent paper. The cell pellets were resuspended in 0.2 ml of phosphate buffered saline and the percentage of cells containing fluorescent spheres was determined by flow cytometry using FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipped with an air cooled argon laser, providing an excitation at 488 nm. Hemocyte cell populations were defined based on their forward (FSC) and right angle (side) scatter (SSC) properties. A FSC threshold was used to eliminate cell debris and bacteria. Fluorescence emission was collected at 520 nm. The cytometer was usually operated at a medium flow rate. A total of 5000–10 000 events was acquired for each sample and stored in the list mode data format. The data were then analyzed using the WinMDI (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry) software. A phagocytic index was measured as the percentage of cells that had ingested three or more fluorescent beads. The phagocytic capacity of hemocytes was also measured as the mean number of engulfed beads within the phagocytic hemocytes population. In some experiments, phagocytosis was measured in

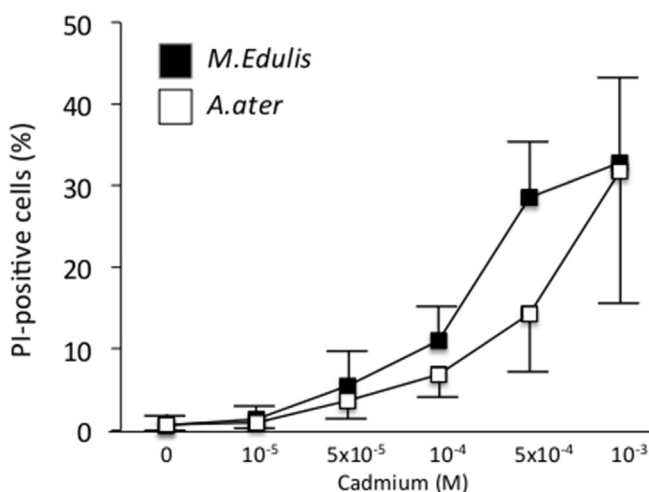


Fig. 5. Viability of hemocytes following exposure to cadmium. Hemocytes were exposed overnight at 18 °C with increasing concentrations of cadmium. After 18 h, viability of hemocytes was evaluated by measuring PI uptake by flow cytometry. The results are representative of at least three independent experiments.

presence of increasing concentrations (10^{-9} to 10^{-3} M) of cadmium chloride (Sigma–Aldrich, Oakville, ON, Canada) before addition of the beads.

4.3. Cell viability

The viability of cells following exposure to cadmium was determined by flow cytometry using propidium iodide (PI). In brief, 1 μ l of a 1 mg/ml stock solution of propidium iodide (PI) (Sigma–Aldrich) was added to each cell suspension and flow cytometric acquisition of the cell suspensions was performed as described above except that fluorescence emission was collected at 625 nm.

4.4. Cadmium-induced apoptosis

Suspensions of hemocytes (10^6 cells/ml) were prepared and used to distribute 10^5 cells/well in round-bottomed 96-well plates. Hemocytes were then exposed to increasing concentrations of cadmium (10^{-9} to 10^{-3} M) as described (Sauvé et al., 2002). After an 18 h incubation period at 18 °C in the dark, cell suspensions were transferred to 5 ml polystyrene tubes. Phosphatidylserine (PS) externalization of apoptosis was determined by two-color flow cytometric analysis using Fluor® 488-conjugated Annexin V (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) and PI uptake. In some experiments, two-color analysis of cadmium-induced apoptosis was

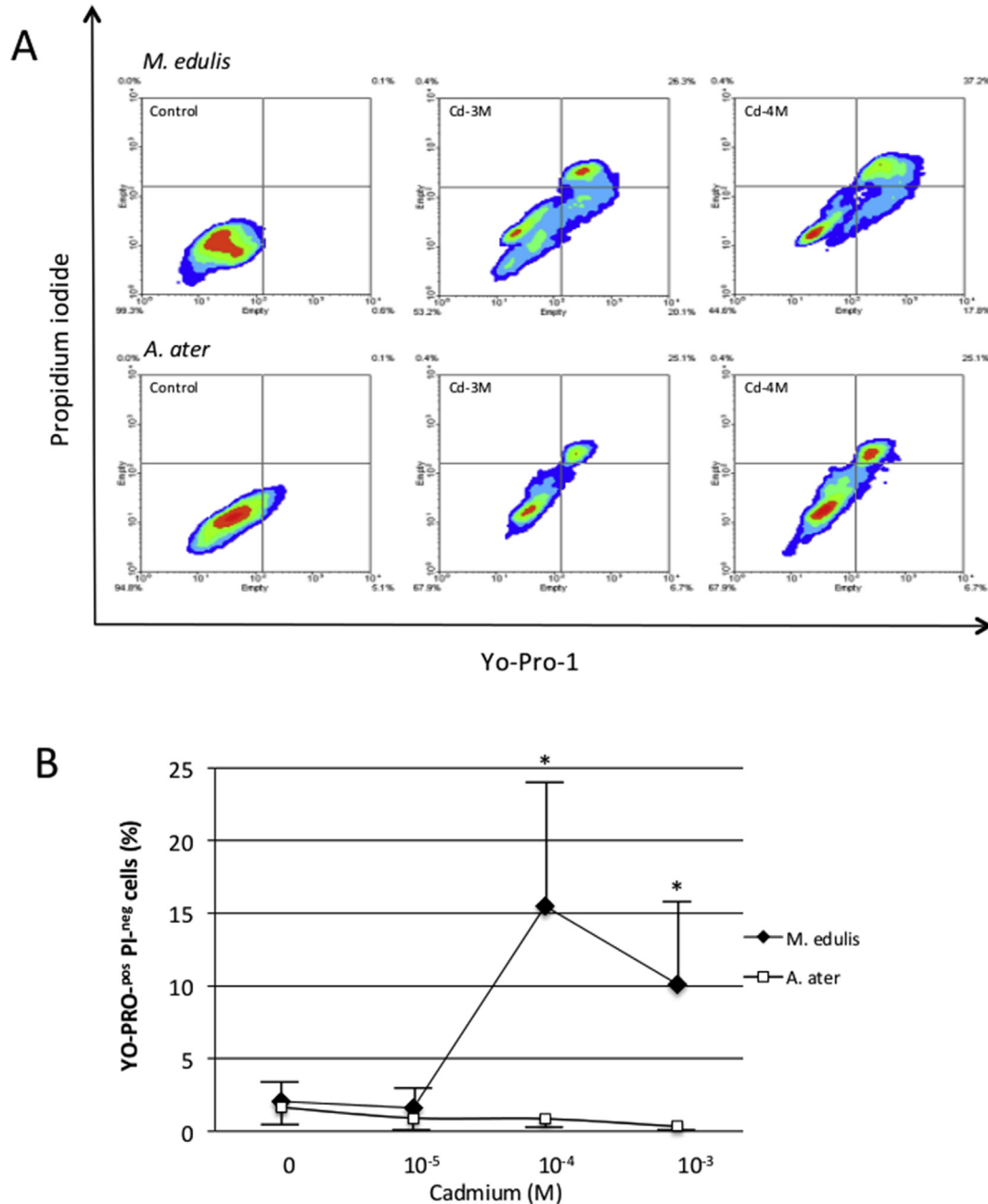


Fig. 6. Measure of cadmium-induced apoptosis using YO-PRO-1. (A) Two-color flow cytometric analysis of hemocytes exposed *in vitro* to increasing concentrations of cadmium (Cad at 10^{-3} M and 10^{-4} M). The representative two-dimensional density plots show uptake of YO-PRO-1 (intensity signal reported on the horizontal axis) and PI (intensity signal reported on the vertical axis) were measured after incubation by flow cytometry. Controls included hemocyte incubated for the same period of time without cadmium. (B) The histogram shows the percentages of YO-PRO-1-positive/PI-negative (early apoptotic) cells (upper right quadrants of the two-color density plots shown in (A)). * $p < 0.05$. The results are representative of at least two independent experiments.

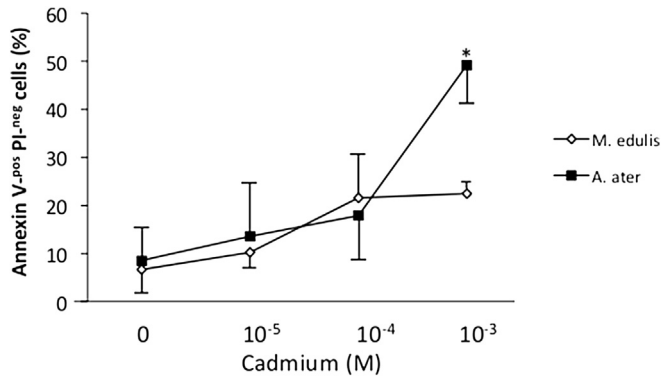


Fig. 7. Measure of cadmium-induced apoptosis using Annexin V-PI staining. Cells were exposed at 18 °C for 18 h to increasing concentrations of cadmium before staining with Annexin V-FITC and PI. The two-colors histogram shows the percentages of Annexin V-positive/PI-negative (early apoptotic) cells. * $p < 0.05$. The results are representative of at least two independent experiments.

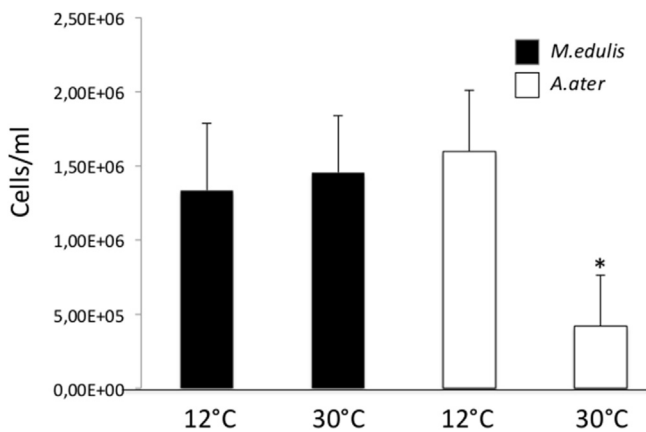


Fig. 8. Effect of an acute thermal stress on hemocyte counts. Mussels were immersed in water for 1 h at 30 °C (or at 18 °C as a control) before hemocyte counts. The results are representative of 4 independent experiments.

carried out using the nuclear impermeant dye YO-PRO-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Idziorek et al., 1995). Concentrations of Fluor® 488-conjugated Annexin V and YO-PRO-1 were used according to the manufacturer's instructions.

4.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad software. The differences between groups were tested for statistical significance using Student's t test. A P value of <0.05 was considered significant. All data are expressed as the mean \pm S.D. n represents the number of experiments on individual animals.

Summary statement

we report that two species of mussels that cohabit in the same subantarctic marine microenvironment have distinct sensitivity to environmental stresses.

Financial support

Supported by the National Science and Engineering Council of Canada (NSERC) STPGP 430539, the Agence Nationale de la Recherche (ANR), the French Polar Institute Paul Emile Victor (IPEV,

Project N°409 IMMUNOTOXKER), and the Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF).

Acknowledgments

The authors would like to thank Ms Marlène Fortier for her technical help, all the personnel from the French Polar Institute Paul Emile Victor (IPEV) for their logistic support, and *les Météos*, Vincent Terol, Jean-François Laclavetine, and Didier Boutenet for their help and hospitality during our stay in the Kerguelen archipelago.

Appendix. ASupplementary data

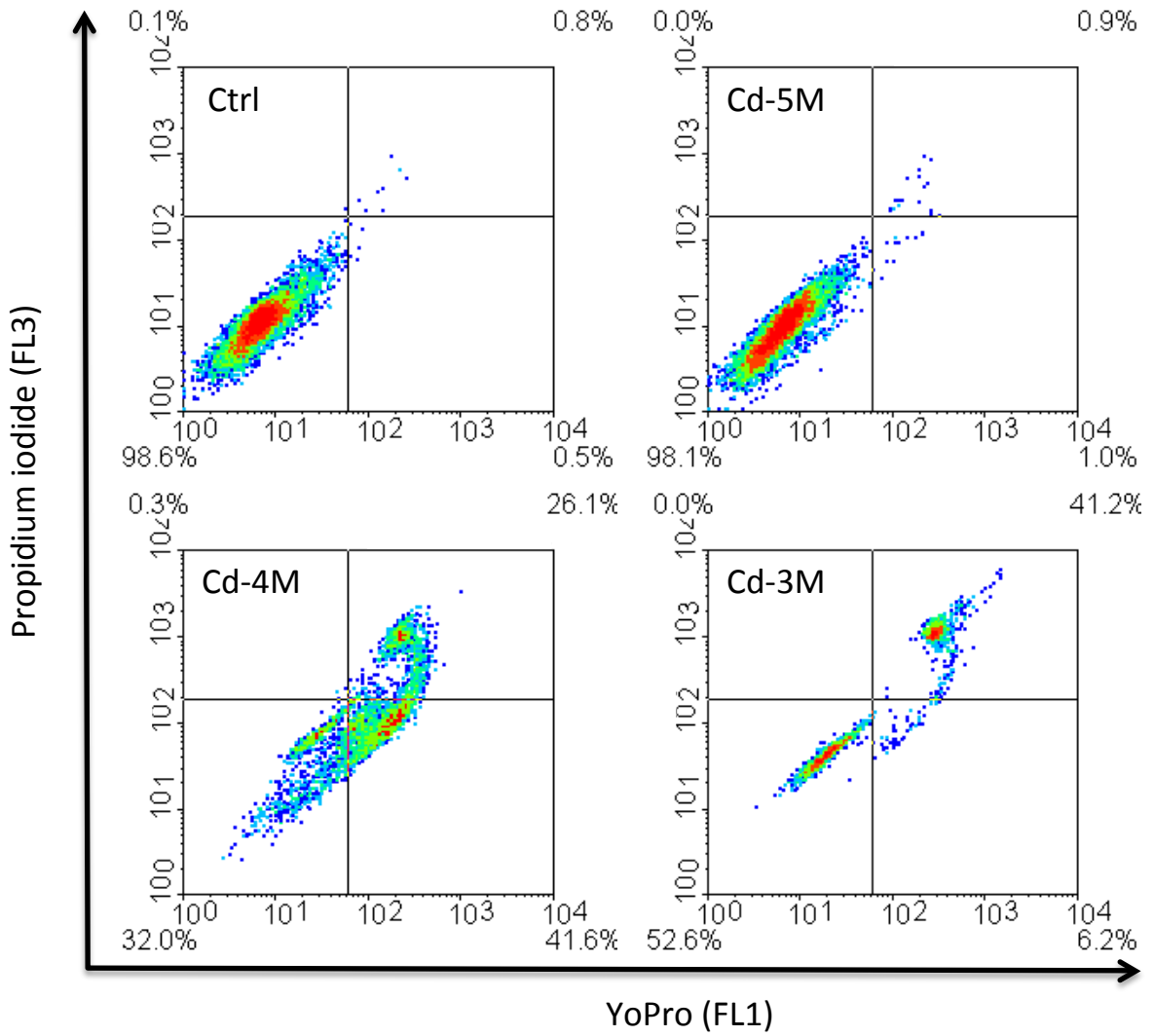
Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.09.003>.

References

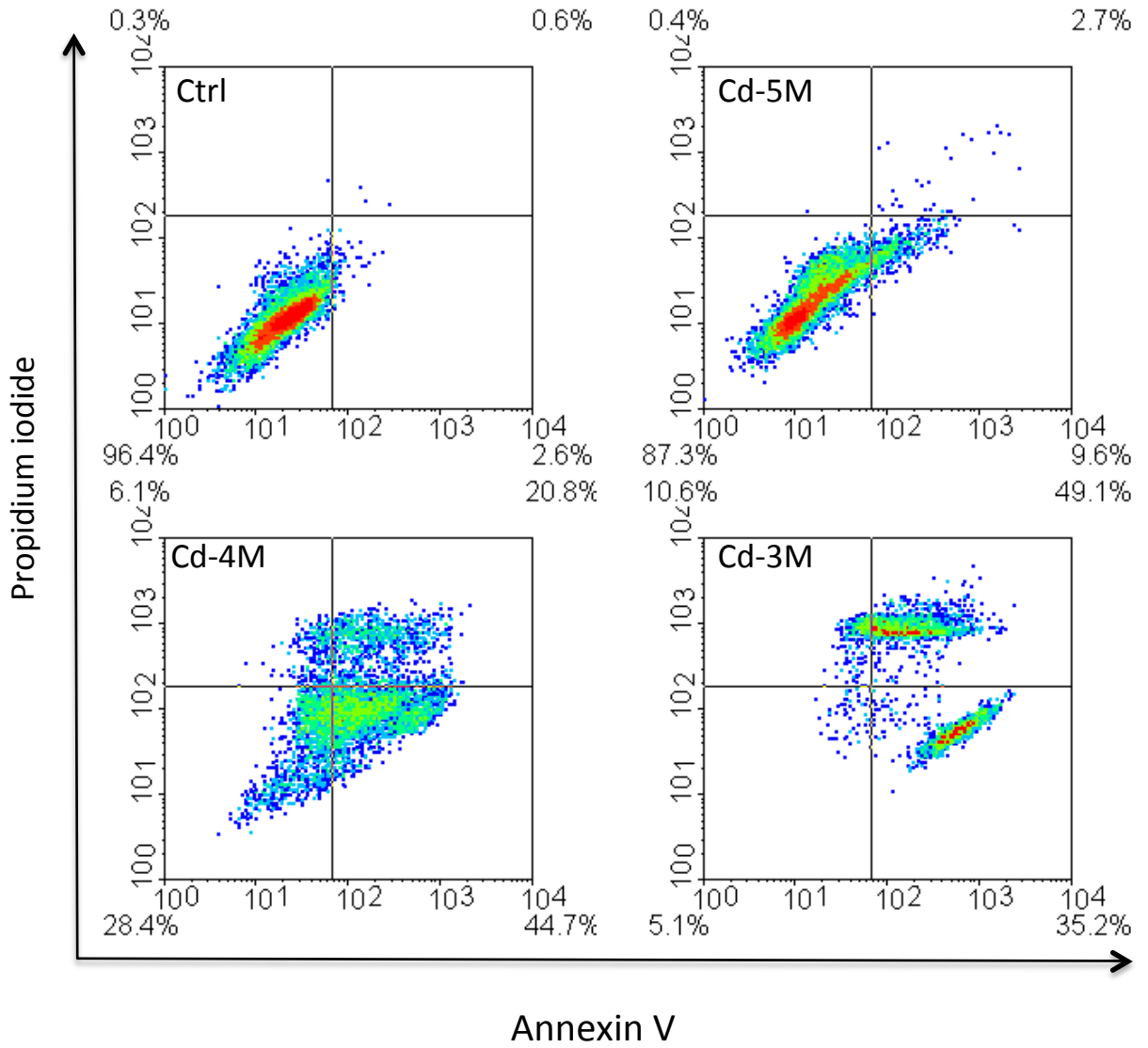
- Bernier, J., Brousseau, P., Krzystyniak, K., Tryphonas, H., Fournier, M., 1995. Immunotoxicity of heavy metals in relation to Great Lakes. *Environ. Health Perspect.* 103, 23–34.
- Blot, M., Thiriou-Quévieux, C., Soyer, J., 1989. Genetic differences and environments of mussel populations in Kerguelen Islands. *Polar Biol.* 10, 167–174.
- Braby, C.E., Somero, G.N., 2006a. Ecological gradients and relative abundance of native (*Mytilus trossulus*) and invasive (*Mytilus galloprovincialis*) blue mussels in the California hybrid zone. *Mar. Biol.* 148, 1249–1262.
- Braby, C.E., Somero, G.N., 2006b. 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., Fournier, M., 2013. Aquatic Immunotoxicity. In: *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Netherlands, pp. 79–88.
- Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Fournier, M., 1999. 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.
- Carajaville, M.P., Pal, S.G., 1995. Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. *Cell Struct. Funct.* 20, 355–367.
- Carballal, M.J., Carmen Lopez, M., Azevedo, C., Viallaba, A., 1997. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Organ* 29, 127–135.
- Coles, J.A., Farley, S.R., Pipe, R.K., 1995. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Dis. Aquat. Organ* 22, 59–65.
- Donaghy, L., Volety, A.K., 2011. Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: in vitro impacts of temperature. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 808–814.
- Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K.S., Soudant, P., 2009. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussates*) and the manila clam (*Ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects. *Aquaculture* 297, 10–24.
- Farcy, E., Serpentine, A., Fiévet, B., Lebel, J.M., 2007. Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture. *Comp. Biochem. Phys. B* 146, 540–550.
- Fields, P.A., Zuzow, M.J., Tomanek, L., 2012. Proteomic responses of blue mussel (*Mytilus*) congeners to temperature acclimation. *J. Exp. Biol.* 215, 1106–1116.
- Fortier, M., Omara, F., Bernier, J., Brousseau, P., Fournier, M., 2008. Effects of physiological concentrations of heavy metals both individually and in mixtures on the viability and function of peripheral blood human leukocytes in vitro. *J. Toxicol. Environ. Health A* 71, 1327–1337.
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Fournier, M., Durand, M.J., Talbot, A., 2008. Relationships between intertidal clam population and health status of the soft-shell clam *Mya arenaria* in the St. Lawrence estuary and saguenay fjord (Québec, Canada). *Environ. Int.* 34, 30–43.
- Goldberg, E.D., Bertine, K.K., 2000. Beyond the mussel watch—new directions for monitoring marine pollution. *Sci. Total Environ.* 247, 165–174.
- Idziorek, T., Estaquier, J., De Bels, F., Ameisen, J.C., 1995. YO-PRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods* 185, 249–258.
- Jones, S.J., Mieszkowska, N., Wethey, D.S., 2009. Linking thermal tolerances and biogeography: *Mytilus edulis* (L.) at its southern limit on the east coast of the United States. *Biol. Bull.* 217, 73–85.
- Jones, S.J., Lima, F.P., Wethey, D.S., 2010. Rising environmental temperatures and biogeography: poleward range contraction of the blue mussel, *Mytilus edulis* L., in the western Atlantic. *J. Biogeogr.* 37, 2243–2259.
- Kondoh, M., Araragi, S., Sato, K., Higashimoto, M., Takiguchi, M., Sato, M., 2002. Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60 cells. *Toxicology* 170, 111–117.
- Lebouvier, M., Laparie, M., Hullé, M., Marais, A., Cozic, Y., Lalouette, L., Vernon, P.,

- Candresse, T., Frenot, Y., Renault, D., 2011. The significance of the sub-Antarctic Kerguelen islands for the assessment of the vulnerability of native communities to climate change, alien insect invasions and plant viruses. *Biol. Invasions* 13, 1195–1208.
- Lockwood, B.L., Sanders, J.G., Somero, G.N., 2010. Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*): molecular correlates of invasive success. *J. Exp. Biol.* 213, 3548–3558.
- Mao, W.P., Ye, J.L., Guan, Z.B., Zhao, J.M., Zhang, C., Zhang, N.N., Oing, J., Tian, T., 2007. Cadmium induces apoptosis in human embryonic kidney (HEK) 293 cells by caspase-dependent and-independent pathways acting on mitochondria. *Toxicol. Vitro* 21, 343–354.
- Minier, C., Lelong, C., Djemel, N., Rodet, F., Tutundjian, R., Favrel, P., Mathieu, M., Leboulenger, F., 2002. Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 54, 455–459.
- Mosca, F., Narcisi, V., Calzetta, A., Gioia, L., Finioia, M.G., Latini, M., Tiscar, P.G., 2013. Effects of high temperature and exposure to air on mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lmk 1819) hemocyte phagocytosis: modulation of spreading and oxidative response. *Tissue Cells* 45, 198–203.
- Parry, H.E., Pipe, R.K., 2004. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.* 69, 311–325.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Carissan, F.M.M., Ramanathan, K., 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel. *Mytilus Edulis*. *Aquat. Toxicol.* 46, 43–54.
- Plantin-Carrenard, E., Bringuier, A., Derappe, C., Pichon, J., Guillot, R., Bernard, M., Foglietti, M.J., Feldmann, G., Aubery, M., Braut-Boucher, F., 2003. A fluorescence microplate assay using yopro-1 to measure apoptosis: application to HL60 cells subjected to oxidative stress. *Cell Biol. Toxicol.* 19, 121–133.
- Pollero, R.J., Huca, G., Brenner, R.R., 1985. Role of hemocytes and plasma on lipid transport in freshwater mollusk. *Diplodon Delodontus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 82 A, 339–343.
- Rault, P., Fortier, M., Pédelucq, J., Lacaze, E., Brousseau, P., Auffret, M., Fournier, M., 2013. Immunotoxicity of heavy metals (silver, cadmium, mercury and lead) on marine bivalve *Mytilus edulis*: in vitro exposure of hemocytes. *J. Xenobiot.* 3, e8.
- Ravichandran, K.S., 2010. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J. Exp. Med.* 207, 1807–1817.
- Rokic, M.B., Stojilkovic, S.S., 2013. Two open states of P2X receptor channels. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 215.
- Romero, A., Estevez-Calvar, N., Dios, S., Figueras, A., Novoa, B., 2011. New insights into the apoptotic process in mollusks: characterization of caspase genes in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One* 6, e17003.
- 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. Toxicol.* 58, 189–200.
- Schneider, K.R., Helmuth, B., 2007. Spatial variability in habitat temperature may drive patterns of selection between an invasive and native mussel species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 339, 157–167.
- Shenker, B.J., Datar, S., Mansfield, K., Shapiro, I.M., 1997. Induction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds: a flow cytometric analysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143, 397–406.
- Sokolova, I.M., Evans, S., Hughes, F.M., 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *J. Exp. Biol.* 207, 3369–3380.
- Stachowicz, J.J., Terwin, J.R., Whitlatch, R.B., Osman, R.W., 2002. Linking climate change and biological invasions: ocean warming facilitates nonindigenous species invasions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15497–15500.
- Sun, J., Wang, A., Zhang, T., 2010. Flow cytometric analysis of defense functions of hemocytes from the penaeid shrimp. *Penaeus Vannamei*. *J. World Aqua. Soc.* 41, 92–105.
- Terahara, K., Takahashi, K.G., 2008. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. *Curr. Pharm. Des.* 14, 131–137.
- Tomanek, L., Zuzow, M.F., 2010. The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress. *J. Exp. Biol.* 213, 3559–3574.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., 1995. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J. Immunol. Method* 184, 39–51.
- Yao, C.L., Somero, G.N., 2012. The impact of acute temperature stress on hemocytes of invasive and native mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*): DNA damage, membrane integrity, apoptosis and signaling pathways. *J. Exp. Biol.* 215, 4267–4277.
- Yao, C.L., Somero, G.N., 2013. Thermal stress and cellular signaling processes in hemocytes of native (*Mytilus californianus*) and invasive (*M. galloprovincialis*) mussels: cell cycle regulation and DNA repair. *Comp. Biochem. Phys. B* 165, 159–168.

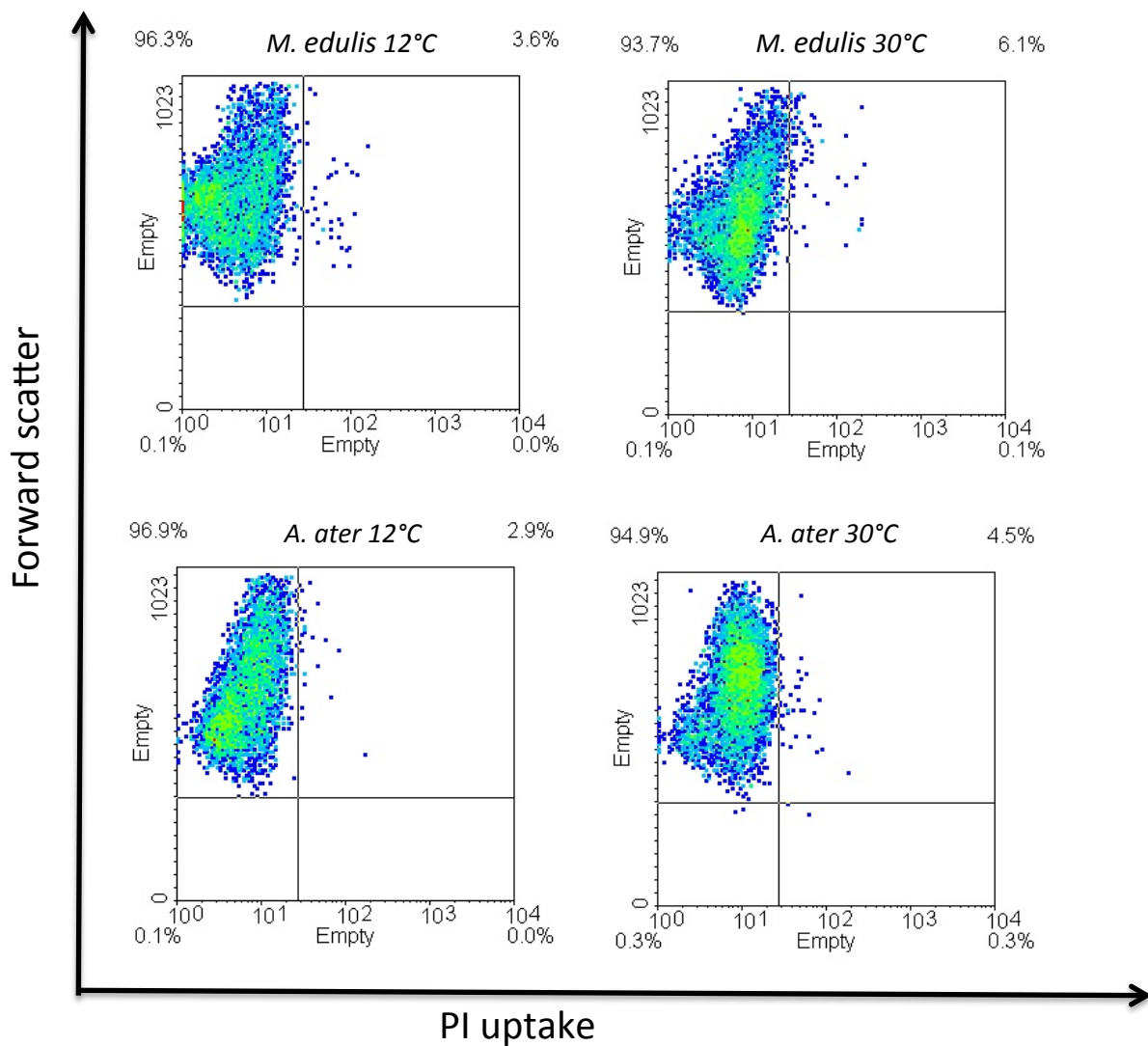
Supplementary figure S1



Supplementary figure 2



Supplementary figure 3



Supplementary figure 4



CHAPITRE III

6. LES HÉMOCYTES RELARGUÉS DANS L'EAU DE MER AGISSENT COMME UN CHEVAL DE TROIE POUR DISSIMINER L'INFECTION

Caza, F., Bernet, E., Veyrier, F. J., Betoulle, S., & St-Pierre, Y. (2020). Hemocytes released in seawater act as Trojan horses for spreading of bacterial infections in mussels. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12.

RÉSUMÉ

Le réchauffement global impacte sur les écosystèmes marins en plus d'être associé à des augmentations des épisodes de mortalité de masse chez les invertébrés particulièrement chez les bivalves. Les connaissances actuelles ne nous permettent pas de comprendre les conséquences pathophysiologiques chez les bivalves, entre la propagation des pathogènes et l'augmentation de la température des océans. Dans cet article, nous démontrons que les hémocytes de moules soumises à un stress thermique quittent le compartiment vasculaire vers le liquide intervalvaire pour ensuite être relâchées dans l'eau de mer. Les hémocytes peuvent survivre plusieurs heures dans l'eau de mer avant d'être recaptées par une autre moule. Les hémocytes infectées par le *Mycobacterium marinum* peuvent entrer dans la circulation d'une moule naïve et promouvoir la dissémination de l'infection chez son hôte. Ces résultats révèlent l'existence d'un nouveau mécanisme opportuniste pour disséminer l'infection chez son hôte. Ce mécanisme pourrait expliquer la mortalité de masse rencontrée épisodiquement chez les bivalves au cours des récentes années.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Yves St-Pierre, Stéphane Betoulle et moi avons conceptualisé le plan expérimental. Les expériences concernant l'infection des hémocytes (en confinement 2) ont été réalisées en collaboration avec Ève Bernet sous la supervision de Frédéric Veyrier. J'ai mené toutes les expériences à l'exception de la microscopie électronique et du compte bactérien CFU (Ève Bernet et Frédéric Veyrier). Marlène Fortier a participé aux analyses par cytométrie en flux à l'IAF-INRS. L'interprétation des résultats et la révision de l'article ont été partagées entre Yves St-Pierre, Stéphane Betoulle et moi. Stéphane Betoulle et Yves St-Pierre ont fait les demandes de

financements et organisé la logistique pour la partie de l'étude effectuée à Kerguelen. Tous les auteurs ont participé à la rédaction et à la révision du manuscrit.



OPEN

Hemocytes released in seawater act as Trojan horses for spreading of bacterial infections in mussels

France Caza¹, Eve Bernet², Frédéric J. Veyrier², Stéphane Betoulle^{3✉} & Yves St-Pierre^{1✉}

Global warming has been associated with increased episodes of mass mortality events in invertebrates, most notably in bivalves. Although the spread of pathogens is one of multiple factors that contribute to such mass mortality events, we don't fully understand the pathophysiological consequences of sea warming on invertebrates. In this work, we show that in temperature stress conditions, circulating hemocytes in mussels leave the hemolymph to gain access to the intervalvar fluid before being released in seawater. External hemocytes can survive for several hours in seawater before entering other mussels. When infected by bacteria, externally-infected hemocytes can enter naive mussels and promote bacterial dissemination in the host. These results reveal the existence of a new opportunistic mechanism used by pathogens to disseminate in marine ecosystems. Such mechanisms may explain how thermal anomalies triggered by global warming can favor episodic mass mortality observed in recent years in marine ecosystem.

Abbreviations

<i>A. ater</i>	<i>Aulacomya ater</i>
<i>M. desolationis</i>	<i>Mytilus edulis desolationis</i>
<i>M. marinum</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>
IVF	Intervalvar fluid

Because of their ability to accumulate xenobiotics in their tissues, their wide distribution, and their ecological importance, bivalve mollusks have long been recognized as good biological indicators for monitoring the effects of pollution and global warming in marine habitats¹. They have also been exploited worldwide for their economic and nutritional values. Given their sensitivity to bacterial pathogens and development of different forms of cancer, including horizontally-transmitted leukemia^{2,3}, there has been increasing interest in studying the physiology of their immune system, which has until recently received considerably less attention compared to other Metazoans.

All living organisms are constantly threatened by surrounding microorganisms seeking to exploit the same environmental niche. This is particularly true for invertebrates living in marine coastal ecosystems where concentrations of bacteria are notoriously high. Survival and spread of marine bacteria, however, have to contend with several antagonistic factors including light exposure, nutrient deprivation, and physical and chemical properties of seawater⁴, notwithstanding viruses, which kill 20–40% of marine bacteria on a daily basis⁵. When entering into a host, bacteria further face the innate immune response, a crucial first line of host defense against pathogenic microorganisms. In bivalves, elimination of infectious pathogens by the innate immune system involves physical barriers, production of antimicrobial peptides, and phagocytes, which circulate freely in the hemolymph in direct contact with the animal's tissues where they perform local immune surveillance activities⁶. Phagocytic cells are also endowed with the ability to move to other compartments if necessary where they remain functionally competent, allowing them to perform a sentinel role similar to leukocytes in vertebrates^{7,8}. Several studies have further shown that such migration of hemocytes through the pallial (or intervalvar) epithelium is bi-directional⁹. Unfortunately, for pathogens that resist phagocytosis or the action of hydrolytic immune mediators, such bi-directional movement provides an ideal gateway for establishing tissue-specific and/or systemic infection in the host¹⁰. This hypothesis is supported by recent studies showing that infection of hemocytes by some pathogens, such as *Perkinsus marinus*, can upregulate integrin-mediated cell motility of hemocytes, favoring their

¹INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, 531 Boul. Des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada. ²INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Bacterial Symbionts Evolution, Laval, Québec H7V 1B7, Canada. ³Université Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 SEBIO Stress Environnementaux et Biosurveillance des Milieux Aquatiques, Campuss Moulin de la Housse, 51097 Reims, France. ✉email: stephane.betoulle@univ-reims.fr; yves.st-pierre@inrs.ca

trans-epithelial migration and spread of pathogens inside the host¹¹. Taken together, these studies show that movement of hemocytes in bivalves plays a central role in the infection process.

Mussel beds found in intertidal coastal shores are formed by dense aggregations of individuals held together by byssus threads. The density of mussel beds, which can reach up to thousands of individuals per square meter, varies considerably geographically and temporally depending of substrate type, slope and wave exposure¹². Abundance of mussels, however, is very sensitive to abiotic stress factors that exert a significant impact on their community structure. Differences in resistance to thermal stress among species play a central role in controlling biodiversity within a given ecosystem¹³. This is particularly true among mussel populations which often cohabit in the same intertidal zones¹⁴. It is thus critical to better understand how environmental stress factors impact on the relationship between marine bacteria and invertebrates in marine coastal ecosystems and how such interplay may affect the community structure. Here, we report that hemocytes from mussels are released in seawater following temperature stress. Hemocytes can survive for several hours in seawater while remaining functionally competent before entering other mussels. We further show that opportunistic bacteria can infect hemocytes in seawater and take advantage of the entry of hemocytes into other mussels to spread into naive populations.

Results

Release of hemocytes in intervalvar fluids. This study was initiated during our research missions at Kerguelen Islands where we conducted experiments aimed at comparing temperature tolerance between two mussel species occupying the same habitat. During these experiments, we noticed that the intervalvar fluid (IVF), which normally contains very low numbers of hemocytes, was filled with hemocytes when mussels were immersed in 30 °C seawater for 30–90 min, an acute stress model used in other studies and this study to investigate the effect of temperature stress between mussels congeners^{15–19}. This was particularly perceptible to the naked eye in the case of *Aulacomya ater* (*A. ater*, also commonly known as ribbed mussels or Magellan mussels) when the IVF was collected into clear polystyrene tubes. Further comparative analyses with *Mytilus edulis desolationis* (*M. desolationis*, also known as blue mussels) confirmed that viable hemocytes were present in IVF of both mussel species following an acute temperature stress (Fig. 1A). No significant number of hemocytes were detected in IVF of both *M. desolationis* and *A. ater* kept at 8 °C, the normal temperature of coastal marine ecosystems at Kerguelen. Concentrations of hemocytes in IVF of mussels incubated at 30 °C were significantly higher in *A. ater* compared to *M. desolationis*, independently of the IVF volume (Fig. 1B) and concentrations of hemocytes circulating in the hemolymphatic system (Supplementary Fig. S1). The viability (>80%) of cells mobilized in IVF was comparable to that of hemolymphatic hemocytes (Fig. 1C,D). Analysis of the scattering profiles of hemocytes found in the hemolymph and the IVF were similar, suggesting that the passage of hemocytes from the hemolymph to IVF is not selective (Supplementary Fig. S2).

Release of hemocytes in seawater. We next found that hemocytes located in IVF were subsequently released in seawater following the temperature stress (Fig. 2A). The number of hemocytes released in seawater was time-dependent and still detectable up to 4–5 h after the acute temperature stress. Viability of hemocytes released in seawater was confirmed by standard trypan blue exclusion method (Fig. 2A) and PI-staining (Supplementary Fig. S3). Release of viable hemocytes in seawater was also observed when the temperature was gradually increased to 30 °C (Fig. 2B). In the latter case, the release of hemocytes followed a similar pattern to that observed following an acute temperature stress, suggesting that hyperthermia rather than an acute thermal stress per se triggers the release of hemocytes. We also found that the release of hemocytes by *A. ater* was more pronounced when compared to *M. desolationis*, consistent with our previous observations showing higher hemocyte counts in IVF of *A. ater*. The survival of hemocytes in seawater was also time-dependent (Fig. 2C). Moreover, hemocytes in seawater were immune competent, at least in terms of phagocytic activity, and this for both mussel species (Fig. 3).

Transfer of hemocytes into mussels. Our observation that hemocytes are released in seawater and the fact that mussels have a natural tendency to open up their valve²⁰ raised the possibility that hemocytes released in seawater may re-enter other mussels. To address this question, monodispersed suspensions of hemocytes were prepared from donor mussels and stained with CFSE, a dye that accumulates in the cytosol and which is commonly used for tracking cells in vivo by flow cytometry²¹ (Fig. 4A). CFSE-loaded hemocytes were then added to reservoirs containing mussels. At different times thereafter, IVF and hemolymph were collected from recipient mussels and analyzed by two-color flow cytometry for the presence of viable CFSE-positive hemocytes using the PI exclusion dye. Our results showed that CFSE-positive cells were readily detected in IVF of mussels 30 min after addition of CFSE-positive cells and did not vary significantly up to 90 min of incubation times (Fig. 4B). After 90 min, entry of CFSE-positive cells in IVF of recipient mussels was not significantly modulated by seawater temperature (Fig. 4C). Flow cytometric analysis of hemolymph collected from recipient mussels also contained CFSE-positive cells (Fig. 4D).

Infection of mussels by *Mycobacterium marinum*. It is estimated that seawater contains more than 10⁵–10⁶ bacteria per ml^{22,23}. Entry and spreading of bacteria in bivalves, however, faces a strong innate immunity following recognition of pathogens by immune cells and anti-microbial peptides. We thus investigated whether bacteria can take advantage of the release/re-entry mechanism to infect mussels. These studies were carried out upon our return from Kerguelen using *Mytilus* spp. As a model system, we used *Mycobacterium marinum*, a common bacterium found in bodies of fish and seawater²⁴. This slow-growing bacterium is able to infect and survive for several days in macrophage-like cells including amoeba²⁵. To facilitate tracking of *M. marinum*-infected hemocytes, a genetically engineered strain that constitutively expresses the mCherry fluorescent pro-

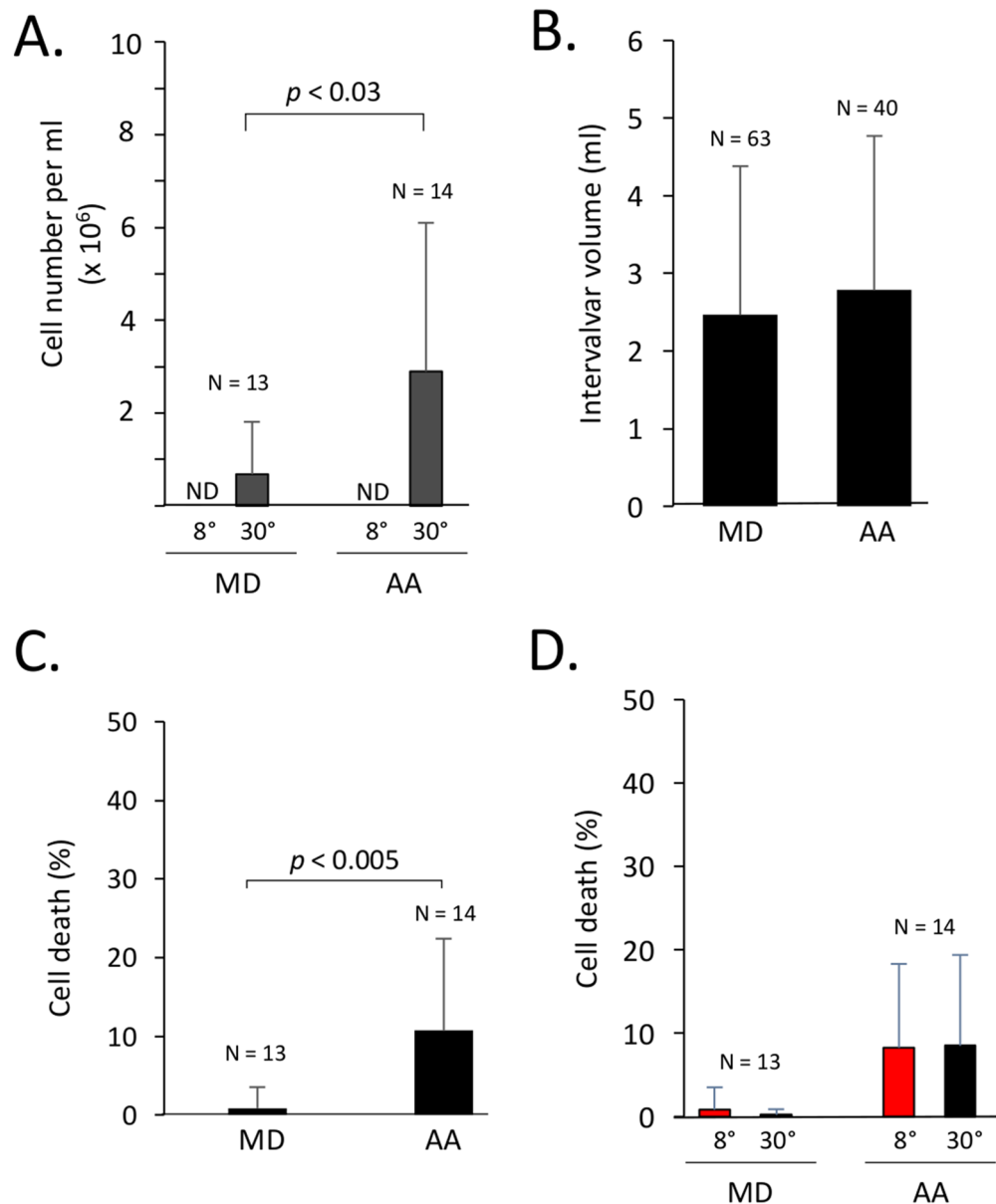


Figure 1. Release of hemocytes in the intervalvar fluid. **(A)** Number of viable hemocytes in the intervalvar fluid (IVF) of *M. desolationis* (MD) and *A. ater* (AA) immediately after acute temperature stress at 30 °C. **(B)** IVF volume collected from MD and AA immediately after the temperature stress. The results represent the pool of two independent experiments. **(C)** Viability of hemocytes found in IVF after the temperature stress as measured by trypan blue dye exclusion. The results represent the pool of five independent experiments. **(D)** Viability of hemolymphatic hemocytes collected immediately after the temperature stress (black bars). Controls were kept at 8 °C (red bars). Viability was measured by trypan blue dye exclusion test. *N.D.* non detectable.

tein was used. We first established by confocal and electron microscopy that *M. marinum* can infect hemocytes (Fig. 5). A standard amikacin protection assay²⁶ confirmed that *M. marinum* can enter, survive and multiply inside infected hemocytes (Supplementary Fig. S4). When infected hemocytes were added to reservoirs containing recipient mussels, we found that they were as effective as free bacteria to survive and grow in IVF (Fig. 6A). Hemolymph collected from recipient mussels further showed that infected hemocytes were significantly more efficient than free bacteria to establish a systemic infection in mussels (Fig. 6B). Taken together, these findings indicate that hemocytes released in seawater can serve as Trojan horses to infect mussels.

Discussion

The idea that bacteria can use immune cells that circulate into the bloodstream to spread throughout the body, even in tissues that are protected by physical barriers, has been well documented. This is especially true for mycobacteria which infect and survive in phagocytic cells²⁷. Here, our findings in mussels indicate the existence of a

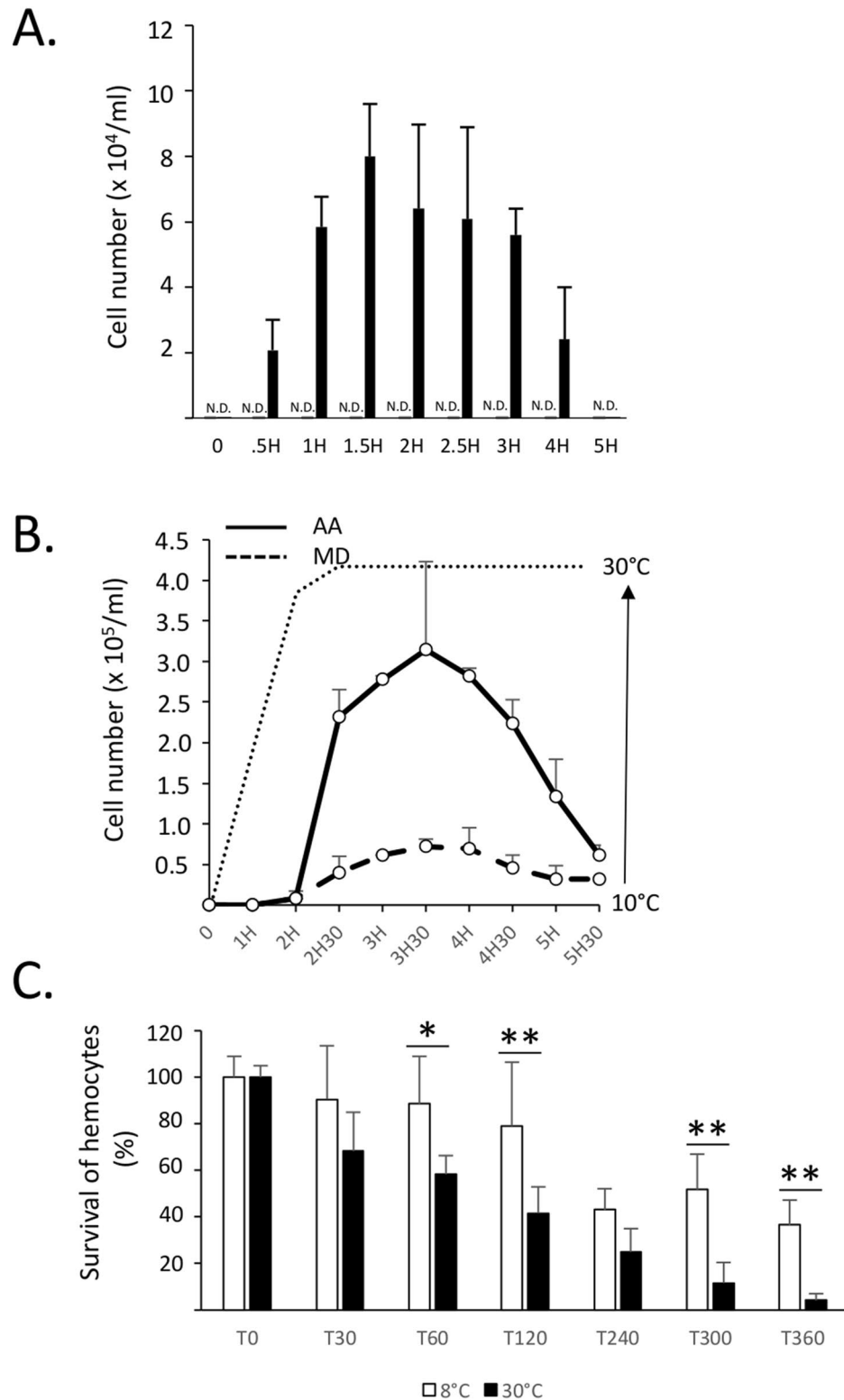


Figure 2. Release of hemocytes in seawater. (A) *A. ater* mussels (n=6) were transferred in 1L tanks filled with seawater at 8 °C (grey bars) and 30 °C (black bars). At different times (minutes) post-transfer, aliquots (triplicates) of 0.5 ml of seawater were collected, centrifuged at low speed for 10 min at room temperature and resuspended in 50 µl of seawater before measuring cell counts in an hemacytometer by standard trypan blue exclusion method. These results are representative of three independent experiments. *N.D.* not detectable. (B) Comparative analysis of the number of viable hemocytes released in seawater by *M. desolationis* (MD) and *A. ater* (AA) (n=10/group) after a progressive increase of temperature. The x axis indicates the times (hours) at which hemocytes were collected. The dotted line does represents the temperature (°C) at different times when hemocytes were collected. (C) Kinetics of survival of hemocytes of *A. ater* of in seawater at different times (min) after addition in tanks containing seawater at 8° and 30 °C. Each time point represents the mean of triplicates. Data are representative of two independent experiments.

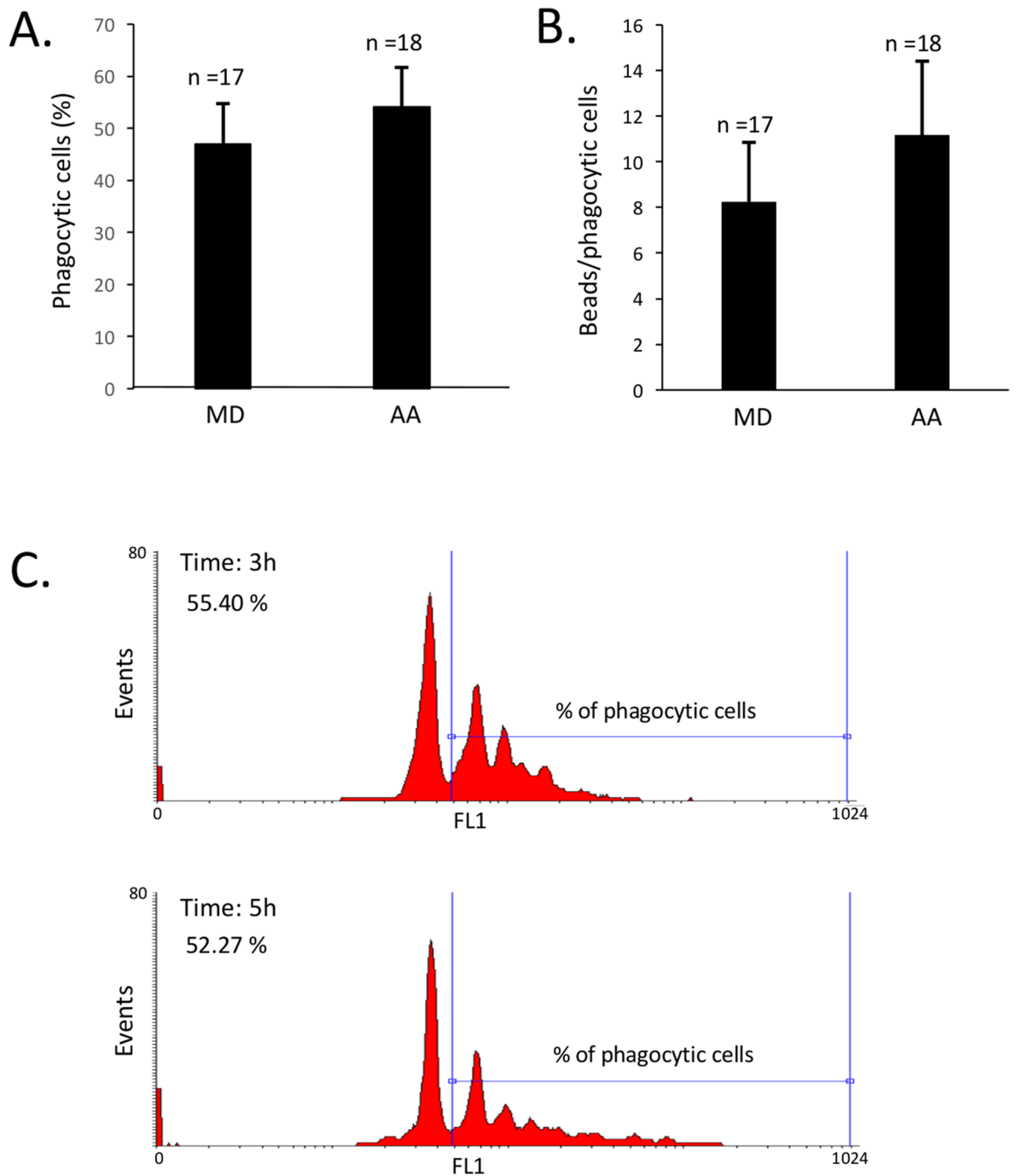
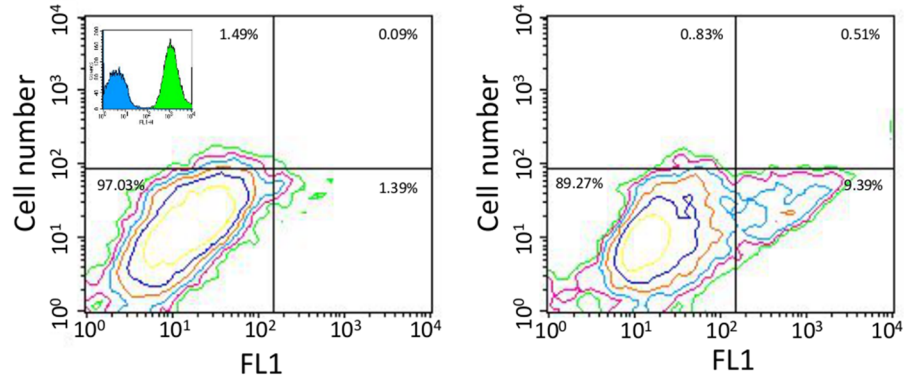


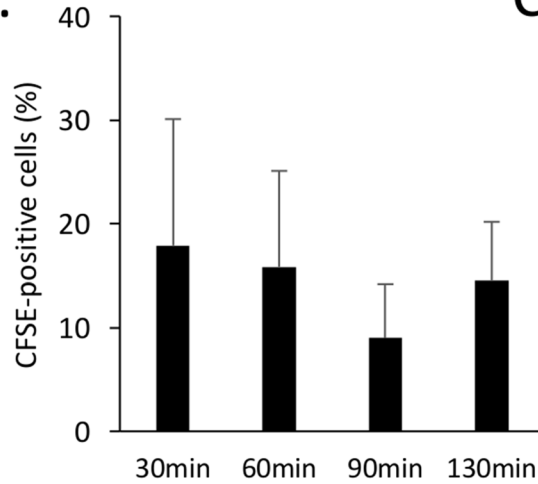
Figure 3. Phagocytic activity of hemocytes released in seawater. **(A)** Percentage of phagocytic cells and **(B)** number of beads phagocytosed by hemocytes released in seawater. The data represent the pool of measures ($n = 17$) taken between 0.5–6 h. The percentages of phagocytic cells and phagocytosed beads did not varied significantly within this interval of time for both mussel species. **(C)** Representative flow cytometric histograms showing phagocytic activity of hemocytes from *A. ater* released in seawater 3 and 5 h after thermal stress.

new opportunistic mechanism used by external bacteria to spread into naive hosts in marine ecosystems. This mechanism is initiated by a temperature- and time-dependent release of circulating hemocytes in IVF. Once in the IVF (also called “shell cavity”), hemocytes are released in seawater where they can survive for several hours while remaining functionally competent, at least in terms of phagocytic activity. This was observed for both *A. ater*, a mussel species only found in the Southern hemisphere, and in blue mussels (*Mytilus* spp.) present in both Southern and Northern hemispheres. We further showed that hemocytes in seawater can enter other mussels before gaining access to their hemolymphatic system. Finally, we found that hemocytes in seawater can be infected by *M. marinum* thereby providing an opportunity for the bacteria to enter and disseminate in naive mussels while being protected from the humoral and cellular components of the innate immune system. Taken

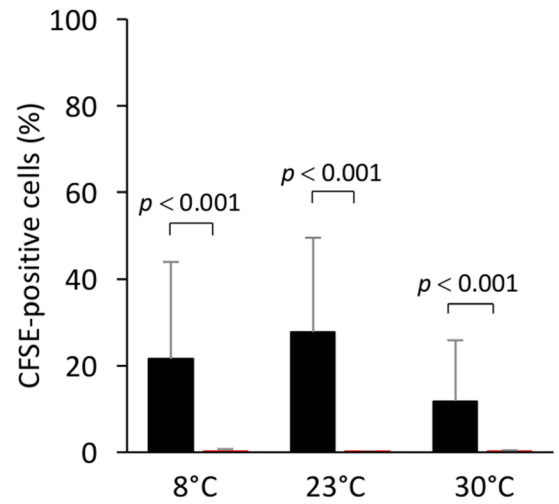
A.



B.



C.



D.

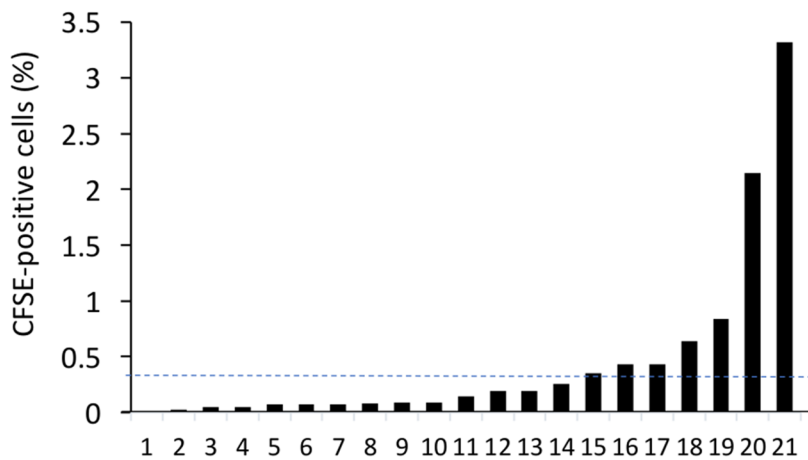


Figure 4. Entry of hemocytes in mussels. CFSE-stained hemocytes from *Mytilus spp.* were added to seawater. After the indicated times, IVF and hemolymph were collected and analyzed for the presence of CFSE-positive cells. (A) A representative contour plot showing hemocytes collected from IVF of mussels incubated without (left) and with CFSE-positive hemocytes (right). In the upper corner of the left contour plot, a representative overlay histogram of unstained (control) hemocytes in blue and CFSE stained hemocytes in green, (B) Effect of temperature on entry of CFSE-positive cells in IVF of mussels. (C) Percentage of CFSE-positive cells recovered in IVF of mussels at different temperatures 90 min after addition of CFSE-stained cells. The autofluorescence controls are shown in red. It shows the autofluorescence as measured in (A) generated by unstained hemocytes recovered in IVF of mussels incubated in the same conditions. (D) Percentages of CFSE-positive cells present in hemolymph of *Mytilus spp.* maintained at 23 °C for 90 min after addition of CFSE-positive cells. The dotted line represents the average of CFSE-positive cells in hemolymph. The data are representative of two independent experiments.

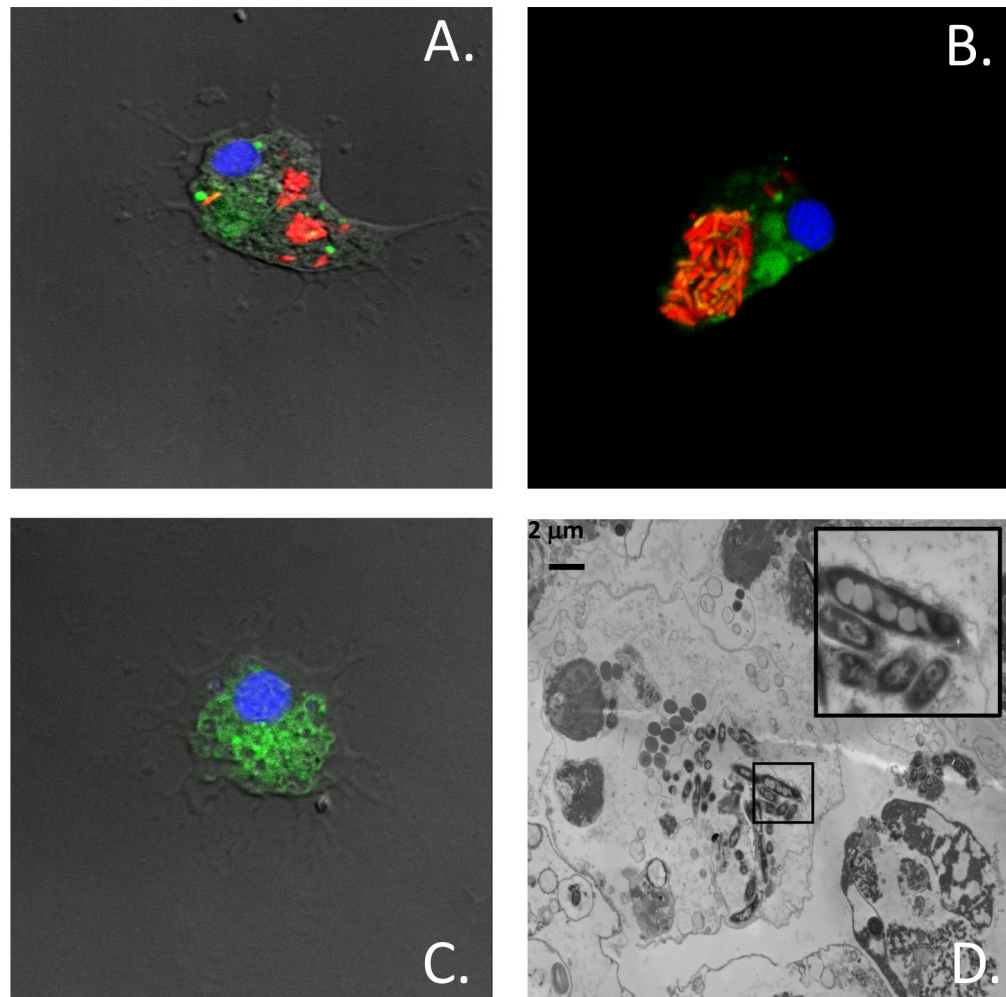


Figure 5. Infection of hemocytes by *M. marinum*. (A,B) Hemocytes from *Mytilus* spp. were infected with mCherry-expressing *M. marinum*. Cells were incubated with the CFSE and H33342 prior to analysis by confocal microscopy. (C) Uninfected hemocytes (Control). (D) Transmission electron microscopy showing a representative hemocyte infected with *M. marinum*. The insert on the upper right shows an enlarged area of the infected cell. The data are representative of two independent experiments.

together, these results suggest that temperature stress may play a critical role in spatial dynamics of pathogen propagation in marine ecosystems.

Although the circulatory system of bivalves is considered a semi-open system, intervalvar fluids of mussels normally contain very low numbers of hemocytes. Following a temperature stress, however, we found that hemocytes were released in IVF of both ribbed and blue mussels in Kerguelen Islands. Release of hemocytes in the IVF and outside the shell was particularly perceptible in *A. ater* compared to *M. desolationis*. Our findings are thus in line with previous studies showing that elevated temperature has significant effects on the physiology of mussels. Elevation of temperature, for example, increases the pumping rate of bivalves, including blue mussels²⁸, possibly due to changes in physical/mechanical factors, such as water viscosity and/or oxygen depletion^{29,30}. A previous study has shown that incubation of mussels at 33 °C induces behavioral responses, most notably rapid valve closure for prolonged periods³¹. Such thermal stress, while may not be as uncommon as we believe given that mussels, being dark in color, is rapidly warmed by the sun up to high temperatures during low tides. Considering the impact of climate change on marine coastal ecosystems, it is likely that exposure of intertidal mussels from Northern and Subantarctic seas to temperature of 30 °C and more will occur with increasing frequency. Several studies have also shown that such temperature stress induces molecular and cellular changes in hemolymphatic hemocytes^{16,32}. It is thus logical to hypothesize that when the temperature reaches a critical threshold, hemocytes emigrate from the hemolymph to be located in IVF and, upon return to normal conditions or gape opening, they are released in seawater. Our experiments using *M. marinum* further support the idea that this mechanism could favor rapid propagation of pathogens in mussel beds. It was noteworthy that entry of bacteria in the hemolymphatic system was more efficient when the bacteria was inside the hemocytes compared to free bacteria. Future investigations will be needed, however, to determine how infected hemocytes trigger systemic infection in the host. It will be important to determine, for example, whether infected hemocytes cross epithelial lining to gain

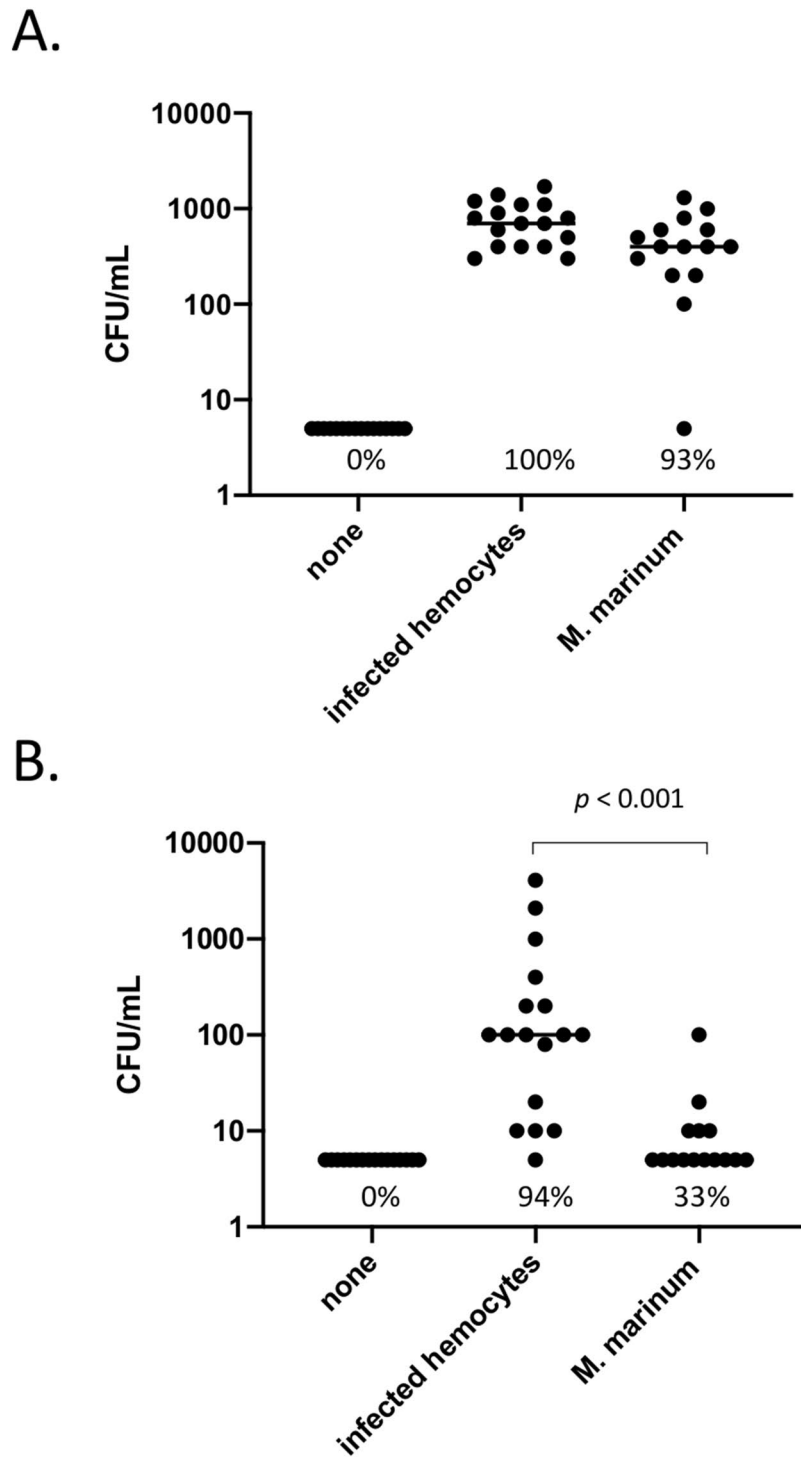


Figure 6. Hemocytes can serve as Trojan horses to infect mussels. Hemocytes infected by *M. marinum* or free bacteria were added to mussels. After 8 days, the number of bacteria in IVF (A) and hemolymph (B) were measured following CFU counts. Each point represents individual CFU counts. The data are representative of two independent experiments.

access to the vascular system and how and where the release of bacteria from infected hemocytes takes place. The results of this study, however, clearly show that temperature stress induces the release of hemocytes in seawater where they survive and are susceptible to bacterial infection, protecting bacteria which can now either enter the host via a Trojan horse mechanisms and/or in their free form. It is also possible that the passage of bacteria in hemocytes increases their virulence, as observed in marine marine microbes including several bivalve pathogens enhance their virulence in contact with host factors. This observation is in fact consistent with the ability of

some bacteria to use phagocytic cells to evade the innate immunity. Such mechanism is particularly efficient in bivalves, and possibly other organisms without MHC class I proteins which normally trigger an adaptive immune response against non-self peptidic antigens. This could provide an explanation to previous studies suggesting that climate warming is associated with increased spreading of pathogens and episodic mass mortality in mussel beds^{33–36}. The increase frequency of mass mortality events in marine coastal ecosystems is indeed attributed, at least in part, to increases of temperatures³⁷. Our observation that release of hemocytes is more pronounced in *A. ater*, a cold-adapted mussel species, compared to *M. desolationis* further suggests that such response may impact local biodiversity of Subantarctic marine coastal ecosystems. Whether this explains the increasing dominance of blue mussels over ribbed mussels in specific regions of the Southern hemispheres remains an open question¹⁴.

Although we still ignore if the release of hemocytes in seawater and their re-entry into other individuals also occur in other bivalves, we do know that it occurs with *Mytilus* spp., suggesting that this migratory behavior of hemocytes is not restricted to mussel populations in Subantarctic regions but rather present in the Northern hemisphere as well. Future studies will be needed to determine how hemocytes proceed from the hemolymphatic circulation to IVF. Based on previous studies in humans and animals, it is logical to hypothesize that elevation of temperature may initiate a cascade of events that include adhesion of hemocytes to activated vascular cells before extravasation through a more permeable vascular system.

From a physiological perspective, our study raises the hypothesis that sharing of hemocytes among mussels may help build a “collective immunity”. On the one hand, entry of activated and functionally competent hemocytes secreting humoral mediators, such as soluble lectins, hydrolytic enzymes, pro-inflammatory factors³⁸, specifically-oriented anti-microbial peptides³⁹, may be used as an alarm signal to the colony to warn against environmental stress. Such sharing of “activated” hemocytes would serve to trigger the immune response more quickly in recipient mussels. In a way, it would be a horizontal transfer of a short term “immune memory”. This possibility leads us to consider that mussel beds have their own immune repertoire and can develop some kind of a “herd immunity”. On the other hand, it may also be involved in the development of immune tolerance against specific bacteria, a form of immune memory of the innate response that has been highlighted following a secondary exposure of *Mytilus galloprovincialis* to *Vibrio splendidus*⁴⁰. Such tolerance would favor systemic homeostasis with the goal of preserving energy, as suggested by studies in corrals⁴¹. Such sharing of hemocytes among mussels would not be, however, without a cost. Our study does indeed provide a mechanistic explanation underlying horizontal transmission of cancer of mussels in the Northern and Southern hemispheres, as recently reported^{2,3,42}. Considering that transformation of cells significantly alters their morphology, it will also be interesting to determine whether cancer cells do behave differently compared to normal hemocytes. There are, however, multiple factors other than morphology that controls migration, including activation state, adhesion molecules, chemokine receptors, etc. Seuront et al.⁴³ have observed that body temperature of Mediterranean blue mussels is frequently above 30 °C, and even more than 35–40 °C. It is logical to assume that global warming will favor external release of normal and leukemic hemocytes, thereby accelerating horizontal transmission of cancer in mussels.

In summary, our findings reveal the existence of a new mechanism triggered by elevated temperatures that may have significant impact on the dissemination of pathogens, and possibly other diseases, in marine coastal ecosystems. Such mechanisms could explain how thermal anomalies triggered by global warming may favor episodic mass mortality in mussel beds observed in recent years.

Methods

Mussels. Adult specimens (55–70 mm length) of *Mytilus edulis desolationis* (*M. desolationis*) and *Aulacomya ater* (*A. ater*) were collected on the intertidal rocky shore of Port-aux-Français (049°21.235S, 070°13.490E) at Kerguelen Islands in December 2018. Mussels were sampled in the intertidal zone and kept in a container containing seawater from the sampling site. The water was oxygenated by aeration and organisms were maintained throughout the transport phase at a water temperature closed to that measured on field (+7.5 °C). Mussels were immediately transferred to the marine laboratory of Port-aux-Français and placed in temperature-controlled (8 °C, pH 7.7, salinity ~34 ‰) aerated 50 l tanks containing filtered recirculating seawater maintained on a 12 h:12 h light/dark cycle. Other adult blue mussels (*Mytilus* spp., 55–70 mm length) were obtained from a commercial supplier (PEI Mussel King Inc., Prince Edward Island, Canada) and placed in a temperature-controlled (4 °C) aerated tank containing 20 l of 32‰ artificial saline water (Reef Crystal artificial marine salt, Instant Ocean, VA, USA). For each experiment, individuals shell lengths and weight were measured.

Collection of hemocytes from intervalvar fluids and hemolymph. Unless otherwise indicated, hemocyte samples were collected from single individuals, without pooling and centrifugation. The intervalvar fluid (IVF) was first carefully and rapidly removed with the tip of a knife to minimize contamination with extrapallial fluids and collected into 15 ml sterile Falcon tubes. Hemolymph was withdrawn from the adductor muscle using a syringe fitted with a 25 gauge needle. The number of viable cells present in cell suspensions was determined by the standard trypan blue exclusion method and/or by flow cytometry using propidium iodide (PI).

Phagocytosis. Phagocytosis assays were carried out as described¹⁹. Briefly, hemocyte suspensions ($1–5 \times 10^5$ cells) were distributed in round-bottomed 96-well plates. Yellow-green latex FluoSpheres (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA; diameter 1.2 µm) were then added to each well at a hemocyte:bead ratio of 1:100. Unless otherwise indicated, all experiments were carried out at 20 °C in the dark. After 18 h, supernatants were removed by gentle flickering and the plates tapped dry on absorbent paper. Cell pellets were resuspended in 0.2 ml of filtered seawater and the percentage of cells containing fluorescent spheres was determined by flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipped with an air-

cooled argon laser, providing an excitation at 488 nm. Hemocyte cell populations were defined based on their forward (FSC) and right angle (side) scatter (SSC) properties. A FSC threshold was used to eliminate cell debris and bacteria. Fluorescence emission was collected at 520 nm. The cytometer was usually operated at a medium flow rate. A total of 5 000–10 000 events was acquired for each sample and stored in the list mode data format. A phagocytic index was measured as the percentage of cells that had ingested fluorescent beads. The phagocytic capacity of hemocytes was also measured as the mean number of engulfed beads within the phagocytic hemocytes population as described¹⁴.

Thermal stress and hemocyte transfer experiments. Following acclimatization, mussels ($n=6$) of similar length were transferred into 1L tanks containing oxygenated seawater at 30 °C or, as controls, at 4 °C (*Mytilus* spp.) or 8 °C (*M. desolationis* and *A. ater*). To measure the release of hemocytes in seawater, at different times (minutes) post-transfer, aliquots of 0.5 ml (triplicates) of seawater were collected, centrifuged at 280×g for 10 min at room temperature and resuspended in 50 μ l of seawater. This cell suspension was used for measuring the number of viable cells present in cell suspensions by light microscopy using standard trypan blue exclusion method and to measure their phagocytic activity as described above.

Tracking of hemocytes. Hemocytes were collected from 60 to 100 blue mussels (*Mytilus* spp.) and subsequently washed in seawater by low speed centrifugation at room temperature. To measure survival of hemocytes in seawater at different temperatures, monodispersed cell suspensions were obtained and cells added to 1L tanks (final cell concentration: 0.5×10^6 cells/ml). At the indicated times, aliquots (0.5 ml) were collected, centrifuged at 280×g for 10 min at room temperature and resuspended in 50 μ l of seawater. This cell suspension was used for measuring the number of viable cells present in cell suspensions by light microscopy using standard trypan blue exclusion method and for measuring phagocytic activity by flow cytometry, as described above. For measuring entry of hemocytes into mussels, hemocytes were stained with 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR) at a final concentration of 10^6 cells/ml following the manufacturer's instructions. After an incubation of 10 min in the dark, cells were washed three times, resuspended and added to 1L tanks containing oxygenated seawater at the indicated temperatures obtain a final concentration of 0.5×10^6 cells/ml. A total of 15–20 adult mussels (*Mytilus* spp.) were then added to each tank. At different times post-transfer, mussels ($n=5$) were removed and their IVF and hemolymphatic cells collected, washed in seawater, and resuspended in seawater for analysis by flow cytometry as described above. A total of 1000–5000 events was acquired for each sample and stored in the list mode data format for analysis using the CellQuestPro software.

Infection of mussels by *Mycobacterium marinum*. Mussels were acclimated for two days before the start of experiment. Hemocytes were collected from adult *Mytilus* spp. as described above, seeded in six-well plates (10^6 cells/well) and incubated with Penicillin–Streptomycin (Pen–Strep) for 24 h to eliminate most of the bacteria, washed three times with seawater. After 24 h, hemocytes were infected with *M. marinum* expressing mCherry⁴⁴ for 6 h at a multiplicity of infection (MOI) 10:1. A standard amikacin protection assay²¹ was performed by adding amikacin (200 μ g/ml) during 1 h to kill extracellular bacteria. Subsequently, infected-hemocytes were washed three times with seawater and incubated for different time (0 h, 24 h, 48 h in Supplementary Fig. S4). Cells were lysed with one ml of Triton 0.1% (v/v) and detached using a sterile cell-scraper. Bacteria were counted using serial dilution on 7H10 agar plate containing hygromycin (50 μ g/ml). Colonies on plate were counted after 2 weeks of growth.

Confocal microscopy. Hemocytes infected with *M. marinum* genetically engineered to express mCherry constitutively were stained with CFSE and Hoescht 33342 (LifeTechnologies) and fixed with paraformaldehyde 2% (v/v). Fixed cells were mounted on microscope glass slides using ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen). Images were acquired in sequential scanning mode on an LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss Micro-imaging) every 370 nm, at a resolution of 200 nm, 63X microscope objective. The 3D images adjustments were as follow: zoom of 3,16 Pixel (0.04 μ m) and a pinhole of 1 airy.

Electron microscopy. Cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer at pH 7.4 with 0.2 M sucrose overnight and then post-fixed in 1.33% osmium tetroxide in Collidine buffer pH 7.4 for 1 h at room temperature. After dehydration by successive passages through 25, 50, 75, 95% and 100% (twice) solutions of acetone in water (for 15–30 min each), samples were immersed for 16–18 h in Spurr:acetone (1:1 v/v). Samples were then embedded in BEEM capsules using Spurr's resin (TedPella) before incubation at 60–65 °C for 20–30 h. After polymerization, samples were sliced using an ultramicrotome (LKB Brooma—2128 Ultratome) and were put onto Formvar and carbon coated-copper 200-mesh grids. Samples were contrasted with 5% uranyl acetate in 50% ethanol (v/v) for 15 min followed by lead citrate for five minutes. Cells were visualized using a Hitachi H-7100 transmission electron microscope with AMT XR-111 camera.

Infection of mussels by *Mycobacterium marinum*. For horizontal transfer experiments, mussels were reared in 10 l polycarbonate tanks (30 mussels/tank) containing seawater with aeration at room temperature. The seawater was renewed daily. The algae *Platymonas helgolandica* var. *tsingtaoensis* and *Isochrysis zhanjian-gensis* were supplied to the mussel as food source as previously described⁴⁵. Mussels were acclimated for 1 week before the start of experiment. In parallel, hemocytes were isolated and infected with *M. marinum* as described above. Infected hemocytes were then added to a reservoir containing mussels. A second (control) group of mus-

sels were challenged with *M. marinum* previously treated with amikacin for 24 h at room temperature. After 2 h, mussels were removed, washed in seawater and re-cultured for 8 days at room temperature. Another control group included mussels not infected with *M. marinum*. At 8-days post-challenge, hemolymph and intervalvar fluids were collected, centrifuged to collect cell pellets and processed for CFU counts as described above.

Statistical analysis. Statistical significance of the experiments was evaluated using the unpaired Student's t-test or the Fisher's exact test. Results were considered statistically significant at $P \leq 0.05$. The non-parametric Mann–Whitney U test was used for comparison of data that were not normally distributed. All data are expressed as the mean \pm S.D. n represents the number of experiments on individual animals.

Received: 23 July 2020; Accepted: 14 October 2020

Published online: 12 November 2020

References

- Beyer, J. *et al.* Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: a review. *Mar. Env. Res.* **130**, 338–365 (2017).
- Metzger, M. J., Reinisch, C., Sherry, J. & Goff, S. P. Horizontal transmission of clonal cancer cells causes leukemia in soft-shell clams. *Cell* **161**, 255–263 (2015).
- Metzger, M. J. *et al.* Widespread transmission of independent cancer lineages within multiple bivalve species. *Nature* **534**, 705–709 (2016).
- Rozen, Y. & Belkin, S. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 513–529 (2001).
- Suttle, C. A. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microbiol. Ecol.* **28**, 237–243 (1994).
- Allam, B. & Raftos, D. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* **131**, 121–136 (2015).
- Allam, B. & Espinosa, E. P. Mucosal immunity in mollusks. In *Mucosal Health in Aquaculture* (eds Beck, B. H. & Peatman, E.) 325–370 (Academic Press, Cambridge, 2015).
- Lau, Y. T., Sussman, L., Espinosa, E. P., Katalay, S. & Allam, B. Characterization of hemocytes from different body fluids of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Fish Shellfish Immunol.* **71**, 372–379 (2017).
- Lau, Y. T., Gambino, L., Santos, B., Espinosa, E. P. & Allam, B. Transepithelial migration of mucosal hemocytes in *Crassostrea virginica* and potential role in *Perkinsus marinus* pathogenesis. *J. Invertebr. Pathol.* **153**, 122–129 (2018).
- Allam, B. & Espinosa, E. P. Bivalve immunity and response to infections: are we looking at the right place?. *Fish Shellfish Immunol.* **53**, 4–12 (2016).
- Lau, Y. T., Gambino, L., Santos, B., Espinosa, E. P. & Allam, B. Regulation of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocyte motility by the intracellular parasite *Perkinsus marinus*: a possible mechanism for host infection. *Fish Shellfish Immunol.* **78**, 18–25 (2018).
- Bodkin, J. L. *et al.* Variation in abundance of Pacific blue mussel (*Mytilus trossulus*) in the Northern Gulf of Alaska, 2006–2015. *Deep Sea Res. Part II* (147), 87–97 (2018).
- Bijlsma, R. & Loeschcke, V. Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *J. Evol. Biol.* **18**, 744–749 (2005).
- Caza, F., Cledon, M. & St-Pierre, Y. Biomonitoring climate change and pollution in marine ecosystems: a review on *Aulacomya ater*. *J. Mar. Biol.* <https://doi.org/10.1155/2016/183813> (2016).
- Farcy, E., Voiseux, C., Lebel, J. M. & Fievet, B. Seasonal changes in mRNA encoding for cell stress markers in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to radioactive discharges in their natural environment. *Sci. Total Environ.* **374**, 328–341 (2007).
- Yao, C. L. & Somero, G. N. Thermal stress and cellular signaling processes in hemocytes of native (*Mytilus californianus*) and invasive (*M. galloprovincialis*) mussels: cell cycle regulation and DNA repair. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **165**, 159–168 (2013).
- Negri, A. *et al.* Transcriptional response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) following exposure to heat stress and copper. *PLoS ONE* **8**, e66802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066802> (2013).
- Heare, J. E., White, S. J., Vadopalas, B. & Roberts, S. B. Differential response to stress in *Ostrea lurida* as measured by gene expression. *Peer J.* **6**, e4261. <https://doi.org/10.7717/peerj.4261> (2018).
- Caza, F. *et al.* Comparative analysis of hemocyte properties from *Mytilus edulis* desolationis and *Aulacomya ater* in the Kerguelen Islands. *Mar. Environ. Res.* **110**, 174–182 (2015).
- Comeau, L. A., Babarro, J. M., Longa, A. & Padin, X. A. Valve-gaping behavior of raft-cultivated mussels in the Ría de Arousa, Spain. *Aquac. Rep.* **9**, 68–73 (2018).
- Weston, S. A. & Parish, C. R. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies: analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J. Immunol. Meth.* **133**, 87–97 (1990).
- Daley, R. J. & Hobbie, J. E. Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescence technique 1. *Limnol. Oceanogr.* **20**, 875–882 (1975).
- Ferguson, R. L. & Rublee, P. Contribution of bacteria to standing crop of coastal plankton 1. *Limnol. Oceanogr.* **21**, 141–145 (1976).
- Aubry, A., Mougari, F., Reibel, F. & Cambau, E. *Mycobacterium marinum*. In *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections* (ed. Schlossberg, D.) 735–752 (McGraw-Hill, New York, 2017).
- Kennedy, G. M., Morisaki, J. H. & Champion, P. A. Conserved mechanisms of *Mycobacterium marinum* pathogenesis within the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 20249–22052 (2012).
- Barker, L. P., George, K. M., Falkow, S. & Small, P. L. Differential trafficking of live and dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages. *Infect. Immun.* **65**, 1497–1504 (1997).
- Nguyen, L. & Pieters, J. The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol.* **15**, 269–276 (2005).
- Jørgensen, C. B., Larsen, P. S. & Riisgård, H. U. Effects of temperature on the mussel pump. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **28**, 89–97 (1990).
- Podolsky, R. D. Temperature and water viscosity: physiological versus mechanical effects on suspension feeding. *Science* **265**, 100–103 (1994).
- Riisgård, H. U. & Seerup, D. F. Filtration rates in the soft clam *Mya arenaria*: effects of temperature and body size. *Sarsia* **88**, 416–428 (2003).
- Dowd, W. W. & Somero, G. N. Behavior and survival of *Mytilus* congeners following episodes of elevated body temperature in air and seawater. *J. Exp. Biol.* **216**, 502–514 (2013).
- Cellura, C., Toubiana, M., Parrinello, N. & Roch, P. HSP70 gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*. *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 984–997 (2006).
- Watermann, B. T. *et al.* Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. *J. Fish Dis.* **31**, 621–630 (2008).

34. Polsenaere, P. *et al.* Potential environmental drivers of a regional blue mussel mass mortality event (winter of 2014, Breton Sound, France). *J. Sea Res.* **123**, 39–50 (2017).
35. Vázquez-Luis, M. *et al.* SOS Pinna nobilis: a mass mortality event in western Mediterranean Sea. *Front. Mar. Sci.* **4**, 220. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00220> (2017).
36. Lattos, A., Giannitsis, I. A., Karagiannis, D. & Michaelidis, B. First detection of the invasive Haplosporidian and Mycobacteria parasites hosting the endangered bivalve Pinna nobilis in Thermaikos Gulf, North Greece. *Mar. Environ. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.104889> (2020).
37. Rivetti, I., Frascchetti, S., Lionello, P., Zambianchi, E. & Boero, F. Global warming and mass mortalities of benthic invertebrates in the Mediterranean Sea. *PLoS ONE* **9**, e115655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115655> (2014).
38. Zhang, Y., Li, J., Yu, F., He, X. & Yu, Z. Allograft inflammatory factor-1 stimulates hemocyte immune activation by enhancing phagocytosis and expression of inflammatory cytokines in *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* **34**, 1071–1077 (2013).
39. Cellura, C., Toubiana, M., Parrinello, N. & Roch, P. Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. *Fish Shellfish Immunol.* **22**, 340–350 (2007).
40. Novoa, B. *et al.* Immune tolerance in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes after repeated contact with *Vibrio splendidus*. *Front. Immunol.* **10**, 1894. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01894> (2019).
41. Palmer, C. V. Immunity and the coral crisis. *Commun. Biol.* **1**, 1–7 (2018).
42. Yonemitsu, M. A. *et al.* A single clonal lineage of transmissible cancer identified in two marine mussel species in South America and Europe. *Elife* **8**, e47788. <https://doi.org/10.7554/eLife.47788> (2019).
43. Seuront, L., Nicastro, K. R., Zardi, G. I. & Goberville, E. Decreased thermal tolerance under recurrent heat stress conditions explains summer mass mortality of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Sci. Rep.* **9**, 1–4 (2019).
44. Carroll, P. *et al.* Sensitive detection of gene expression in mycobacteria under replicating and non-replicating conditions using optimized far-red reporters. *PLoS ONE* **5**, e9823. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009823> (2010).
45. Li, Y. F. *et al.* Elevated seawater temperatures decrease microbial diversity in the gut of *Mytilus coruscus*. *Front. Physiol.* **9**, 839. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00839> (2018).

Acknowledgements

Part of this research project was performed at Port-aux-Français Station (Kerguelen Islands) and supported by the French Polar Institute Paul-Emile-Victor (IPEV). The authors would like to thank all the personnel from the IPEV and the Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF) for their help and hospitality during our stay in the Kerguelen archipelago. The author would also like to thank M. Jesse Tremblay and Ms. Marlène Fortier for their excellent technical help. This work was funded in part by the National Science and Engineering Research Council of Canada (YSP) and IPEV (SB).

Author contributions

F.C., E.B., F.V., S.B., and Y.S.P. conceived the study. All authors were responsible for interpretation of data and critical appraisal. All authors executed experiments. F.C., F.V. and Y.S.P. drafted the manuscript with input from all authors. All authors discussed the results and implications and commented on the manuscript at all stages.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76677-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.B. or Y.S.-P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

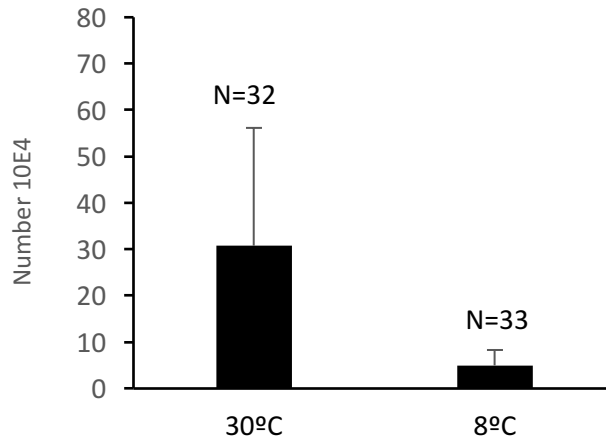
Hemocytes released in seawater act as Trojan horses for spreading of bacterial infections in mussels.

France Caza¹, Ève Bernet², Marlène Fortier¹, Frédéric J. Veyrier²,
Stéphane Betoulle³, and Yves St-Pierre¹

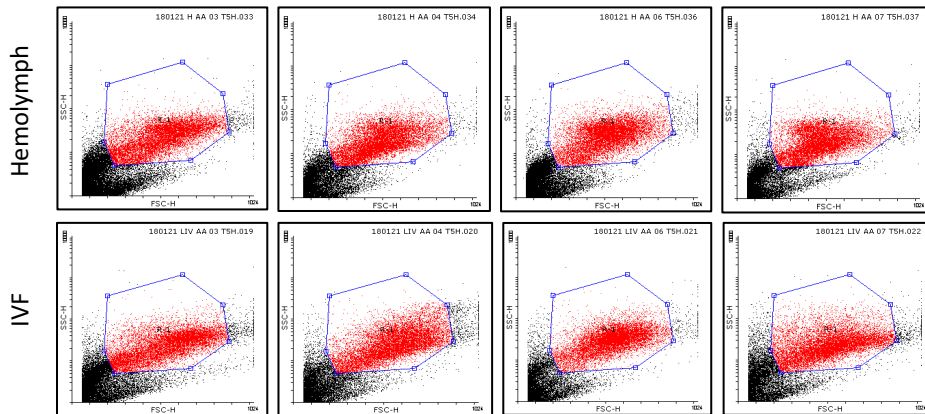
¹INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.

²INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Bacterial Symbionts Evolution,
Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.

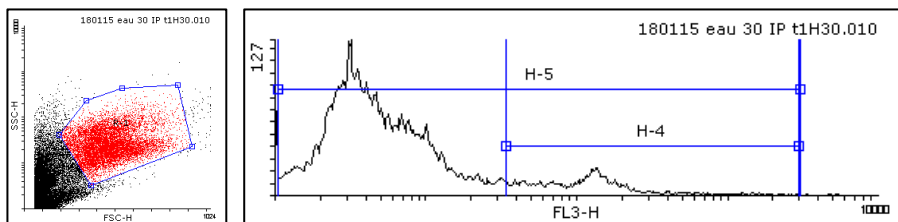
³Université Reims Champagne-Ardenne, Reims, France



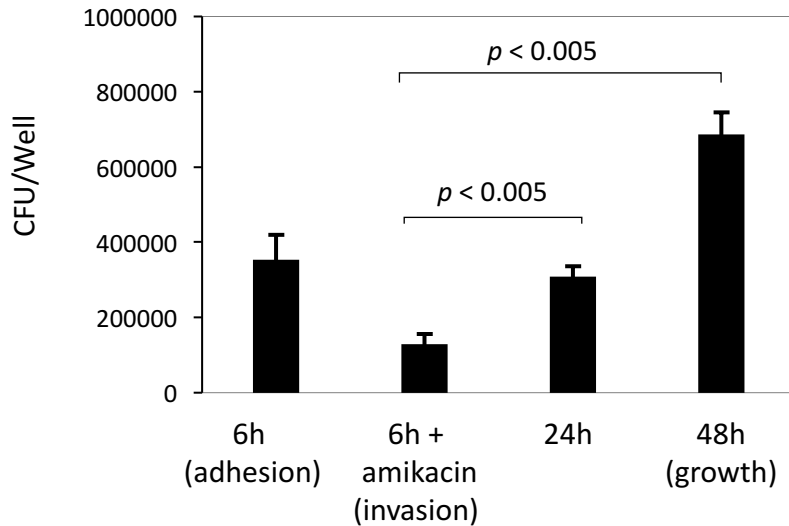
Supplementary figure 1: Release of hemocytes in the intervalval fluid. Number of viable hemocytes (per ml) in the intervalval (IV) fluid of *M. trossulus* exposed to a temperature stress.



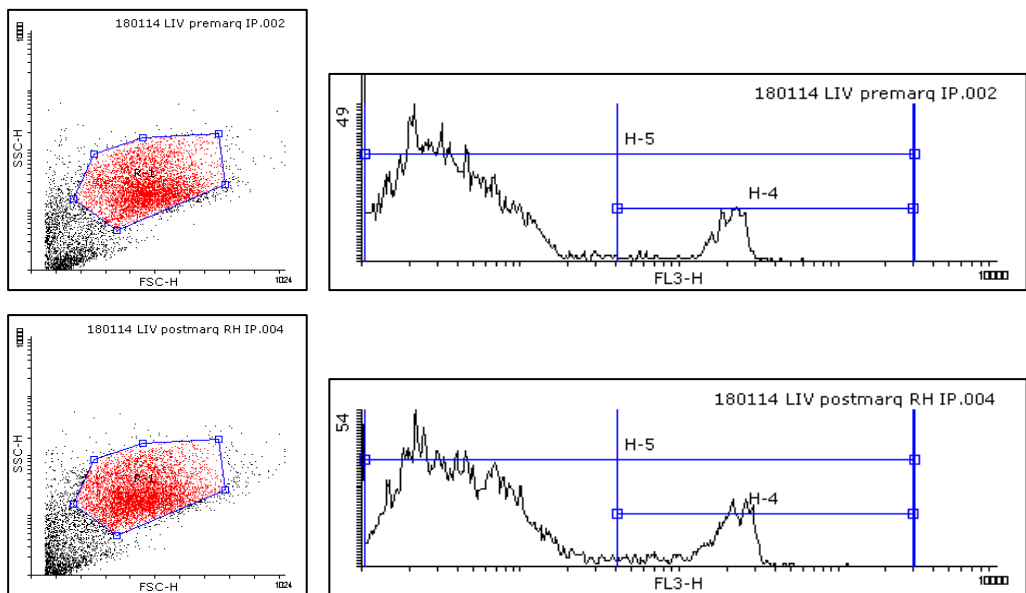
Supplementary figure 2: Scattering profiles of hemolymphatic hemocytes and hemocytes released IVF. The forward scatter (FCS) and side-scatter (SSC) histograms were obtained from four individual *A. ater* at 5h post-temperature stress



Supplementary figure 3: Viability of hemocytes released in seawater. Representative forward scatter (FCS) and side-scatter (SSC) histograms (Left) and fluorescence (FL3, Right) from PI-stained hemocytes collected in seawater at 90 min post-temperature stress of *A. ater*.



Supplementary figure 4: *M. marinum* can enter, survive and multiply inside hemocytes. Hemocytes were infected for 6 hours with *M. marinum* before a 1h treatment with amikacin and subsequent incubation for 24h and 48h. The number of bacteria was determined by CFU counts. Amikacin treatment allow to remove adherent bacteria to the surface and keep only internalized bacteria. The growth of internalized bacteria was counted after 24 and 48 hours. Each bar represents the average of three independent measurements and error bars represent the standard deviation. This experiment was reproduced three times.



Supplementary figure 5: Staining of hemocytes with Rhodamine 123. Representative forward scatter (FCS) and side-scatter (SSC) histograms (*Left*) and fluorescence (FL3, *Right*) from PI-stained hemocytes before (*Upper histograms*) and after (*Lower histograms*) staining with rhodamine.

CHAPITRE IV

7. LA BIOPSIE LIQUIDE APPLIQUÉE À UNE APPROCHE MULTI-OMIQUE CHEZ LA MOULE SENTINELLE

Caza, France, Philippine Granger Joly de Boissel, Richard Villemur, Stéphane Betoulle, and Yves St-Pierre. "Liquid biopsies for omics-based analysis in sentinel mussels." *PloS one* 14, no. 10 (2019).

RÉSUMÉ

La biopsie liquide du plasma sanguin est une méthode simple et non-invasive très prometteuse dans le domaine de la recherche biomédicale. Elle est basée sur l'analyse de biomarqueurs d'acides nucléiques ayant une valeur prédictive. En combinant le concept de biopsie liquide avec la technologie FTA, nous l'avons utilisé avec des moules sentinelles. Ainsi, les hémocytes prélevés lors d'une biopsie liquide peuvent être fixés sur carte FTA pour une analyse du transcriptome. Nous avons démontré que le concept de biopsie liquide est également adaptable pour une analyse métagénomique du microbiome des moules. De plus, nous avons mis en évidence la présence d'ADN circulant libre (ccfDNA) représentant un réservoir génomique facilement accessible. Ces acides nucléiques fixés sur carte FTA demeurent stables à température de la pièce évitant ainsi les contraintes d'une chaîne de froid. Leur performance sont comparables aux échantillons congelés. La technique est idéale pour un échantillonnage en régions éloignées telles les régions polaires. Étant donné que la biopsie liquide est minimalement invasive et non létale, elle présente un intérêt éthique comparativement aux techniques conventionnelles d'échantillonnage tissulaire. Cette approche devrait faciliter la conservation par bio-banque ainsi que faciliter l'utilisation de biomarqueurs multi-omiques afin d'évaluer la qualité des écosystèmes aquatiques.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Tous les auteurs ont participé à la conceptualisation expérimentale et à l'écriture du manuscrit. La méthodologie et l'expérimentation ont été mené par moi avec la participation de Philippine Granger Joly de Boissel. Les analyses métagénomiques ont été réalisées par Philippine Granger Joly de Boissel et moi sous la supervision du professeur Richard Villemur. La validation a été faite par Philippine Granger Joly de Boissel et moi. Stéphane Betoulle et Yves St-Pierre ont fait les

demandes de financements et organisé la logistique pour la partie de l'étude effectuée à Kerguelen.

RESEARCH ARTICLE

Liquid biopsies for omics-based analysis in sentinel mussels

France Caza¹, Philippine Granger Joly de Boissel¹, Richard Villemur¹, Stéphane Betoulle², Yves St-Pierre^{1*}**1** INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada, **2** Université Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 SEBIO, Stress environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques, Reims, France* yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

Abstract

Liquid biopsy of plasma is a simple and non-invasive technology that holds great promise in biomedical research. It is based on the analysis of nucleic acid-based biomarkers with predictive potential. In the present work, we have combined this concept with the FTA technology for sentinel mussels. We found that hemocytes collected from liquid biopsies can be readily fixed on FTA cards and used for long-term transcriptome analysis. We also showed that liquid biopsy is easily adaptable for metagenomic analysis of bacterial profiles of mussels. We finally provide evidence that liquid biopsies contained circulating cell-free DNA (ccfDNA) which can be used as an easily accessible genomic reservoir. Sampling of FTA-fixed circulating nucleic acids is stable at room temperature and does not necessitate a cold-chain protection. It showed comparable performance to frozen samples and is ideally adapted for sampling in remote areas, most notably in polar regions threatened by anthropogenic activities. From an ethical point of view, this minimally-invasive and non-lethal approach further reduces incidental mortality associated with conventional tissue sampling. This liquid biopsy-based approach should thus facilitate biobanking activities and development of omics-based biomarkers in mussels to assess the quality of aquatic ecosystems.

OPEN ACCESS

Citation: Caza F, Joly de Boissel PG, Villemur R, Betoulle S, St-Pierre Y (2019) Liquid biopsies for omics-based analysis in sentinel mussels. PLoS ONE 14(10): e0223525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223525>

Editor: Silvana Allodi, Federal University of Rio de Janeiro, BRAZIL

Received: March 5, 2019

Accepted: September 23, 2019

Published: October 3, 2019

Copyright: © 2019 Caza et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The metagenomic data from this publication have been deposited to the NCBI Sequence Read Archive with the assigned the identifier PRJNA564645.

Funding: Supported in part by the Fondation Armand-Frappier (YSP), the French Polar Institute Paul Émile Victor (IPEV, Project N°409 IMMUNOTOXKER) (SB), and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2019-06607). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Introduction

Because of their ability to accumulate xenobiotics in their tissues, their wide distribution, and their ecological and economical importance, blue mussels (*Mytilus* spp.) have long been recognized as good biological indicators for monitoring the effects of pollution and climate change in marine habitats [1]. Not surprisingly, a relatively large number of biomarkers have been developed, often using a multi-tier approach. They include functional biomarkers based on enzymatic activities or cellular functions, or on measuring concentrations of specific stress indicators [2–4]. In most cases, measure of these biomarkers requires on-site analysis or tissue biopsy performed by trained personnel [5, 6]. It also often requires an uninterrupted cold chain to maintain sample quality. For sampling in remote areas, such as polar regions, this implies complex logistical challenges and considerable risk and cost associated with transportation and storage [7]. The use of formalin-fixed tissue biopsy is an alternative, although

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: FTA, Flinders Technology Associates; ccfDNA, circulating cell-free DNA; EF1 α , Elongation factor 1-alpha; EF1 γ , Elongation factor 1-gamma; SNX14, Sorting Nexin 14; Hsp70, heat shock protein 70; SOD, superoxide dismutase.

formalin is known to affect DNA quality. There are, however, novel methods for collection, storage and shipping of biological samples that offers some solutions to these problems. The Flinders Technology Associates (FTA) cards, for example, can be used to fix and preserve nucleic acids for long-term periods at ambient temperature with high stability [8,9]. This approach has been particularly useful for identification/genotyping and long-term surveillance of infectious pathogens in remote areas at reduced shipping costs [10–11]. The use of FTA cards for monitoring marine habitat with mussels as sentinel species, however, will require concomitant development of nucleic acid-based biomarkers. Fortunately, immense progress in the development has been achieved thanks to new methods in gene sequencing and the need for accurate predictive biomarkers in medicine. Nucleic acid-based biomarkers are particularly well-adapted for liquid biopsies. Liquid biopsy is a concept-based approach that is gaining significant attention in the biomedical area. The concept is that a clinician is able to use a small sample of blood collected from a patient to obtain vital genetic information that can be used: 1) to predict the onset of a disease, 2) to assess the severity of a disease (prognostic), 3) to evaluate and measure with high precision the efficacy of a given treatment, and 4) to determine long-term survival and relapse. It is designed to replace the use of logistically complicated, high cost invasive tissue biopsies to assess ongoing tissue damage. It is largely based on the analysis of circulating cell-free DNA (ccfDNA), which is considered as a genomic reservoir that is easily accessible for studying genetic traits, including genomic alterations [12]. Recent studies in humans have further shown that ccfDNA can be used to identify damages in specific tissues [13]. Liquid biopsies are also compatible for metagenomic data analysis. Microbiome information is now considered an important component of the biomarker schematic [14, 15]. With the help of recent advances in next generation sequencing, microbiome-associated biomarkers, just like ccfDNA, can be used in clinical practice for risk prediction, diagnosis and progression of a disease, or to predict and modulate response to treatment [16]. In marine ecology, microbial biomarkers are also being used for measuring the impact of anthropogenic activities on marine ecosystems [17, 18]. In the present work, we have combined the concept of liquid biopsy and the use of FTA cards to develop a liquid biopsy-based sampling method that involves fixation of nucleic acids on FTA cards. This method is simple, does not require maintaining a cold chain and is compatible with transcriptome analyses. We have also identified, for the first time, circulating cell-free ccfDNA in hemolymph of mussels and performed 16SrDNA gene-based bacterial microbiota profiles of mussels using FTA-fixed bacterial DNA collected from liquid biopsies.

Material and methods

Liquid biopsy

Adult specimens (55–70 mm length) of blue mussels *Mytilus* spp. were obtained from a commercial supplier (PEI Mussel King Inc., Prince Edward Islands, CANADA) and placed in a temperature-controlled (4°C) aerated aquarium containing 10 L of 32‰ artificial saline water (Reef Crystal artificial marine salt, Instant Ocean, VA, USA). For *M. desolationis* and *Aulacomya ater* (*A. ater*) specimens, they were collected on the intertidal rocky shore of Port-aux-Français (Kerguelen Islands, France) as previously described [19]. In all cases, hemolymph was collected from single individuals, without pooling and centrifugation. For routine preparation of liquid biopsies on FTA cards, the intervalvar liquid was removed with the tip of a knife and hemolymph was withdrawn from the adductor muscle using a syringe fitted with a 25 gauge needle. This method has been shown to be minimally invasive and non-lethal for freshwater bivalves [20]. Samples (<1ml of hemolymph) were immediately transferred into sterile 1.5 ml Eppendorf tube and centrifuged for 3 minutes at maximum speed (approx. 3000 x g) at room

temperature using a battery-powered mini-centrifuge (TOMY, Japan) (Fig 1). After centrifugation, aliquots (50 μ l) of supernatants were spotted on individual discs (10 mm diameter) on Whatman 903™ FTA cards (Whatman, Z694827, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). The remaining supernatant was discarded and hemocyte pellets gently resuspended and spotted on FTA cards. In some experiments, Whatman FTA Gene Cards (GE Healthcare, Marlborough, MA) were used. The cards were dried for 15 min at room temperature and stored individually in small (3" x 4") clear 2 mil plastic ziplock baggies containing one silica gel desiccant (1gr/bag) moisture absorber. When indicated, hemolymph were pooled, transferred into a sterile 50 mL and centrifuged for 15 min at 3000 x g on a table low speed centrifuge (Beckman Coulter Allegra 6R). Unless otherwise indicated, all FTA cards were kept at room temperature in the dark.

Isolation of ccfDNA from hemolymph

ccfDNA from hemolymph (5 ml) was carried out using the NucleoSpin Plasma XS kit (Macherey Nagel) with optimized manufacturer's protocols. Purified DNA was quantified by the PicoGreen assay according to the manufacturer's recommendations [21].

Isolation of nucleic acid

For RNA isolation and purification, individual 12 mm² disks from FTA cards were carefully placed at the bottom of a sterile 0.6 ml microcentrifuge tube with a hole punctured in its bottom by a 18G needle. The tube was then transferred into a sterile 1.5 ml microcentrifuge tube before addition of TRIzol (800 μ l) to the upper tube. The cards were soaked with TRIzol for 10 min at room temperature and centrifuged for 3 min at high speed (8000 rpm) in a table centrifuge (BioFuge Fresco, Heraeus Instrument, Grimsby, ON, Canada). The TRIzol solution was transferred and topped with 0.2 ml of chloroform. Tubes were incubated 3 min at room temperature and centrifuged at 12000 x g for 15 min at 4°C. The aqueous phase was used to perform RNA extraction following a standard protocol. The RNA was dissolved in RNase/DNase free water and quantified using the Thermo Scientific™ NanoDrop™ spectrophotometer. DNA was isolated using an adapted the prepGEM™ Universal kit for Blood storage cards (Zygem, Charlottesville, VA). Briefly, 3 mm disc were placed on an eppendorf tube in washed with 100 μ l of DNA-free water and DNA recovered with the prepGEM solution following 5 min incubations at 75°C and 95°C. Nucleic acid samples were stored at -20°C until further analysis. Purified DNA was quantified by the PicoGreen assay (Lumiprobe, Hunt Valley, MD) according to the manufacturer's recommendations [21].

Thermal stress

Following acclimatization, groups of ten mussels of similar length were transferred into tank containing oxygenated seawater at 30°C or at 4°C (control). After 30 min, liquid biopsies were collected. Hemocytes pellets and hemolymph were either fixed on FTA cards or kept frozen at -20°C.

RT-PCR analysis

Total cellular RNA was isolated from cell pellets fixed on FTA cards using the TRIzol reagent (Life Technologies) as described above. First-strand cDNA was prepared from 2 μ g of cellular RNA in a total reaction volume of 20 μ l using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit from Thermo-Fisher. qPCR specificity was carried out with a Rotor-Gene® 3000 (Corbett Research) with primers listed in Table 1. All qPCR reactions were carried out in 20 μ l with the

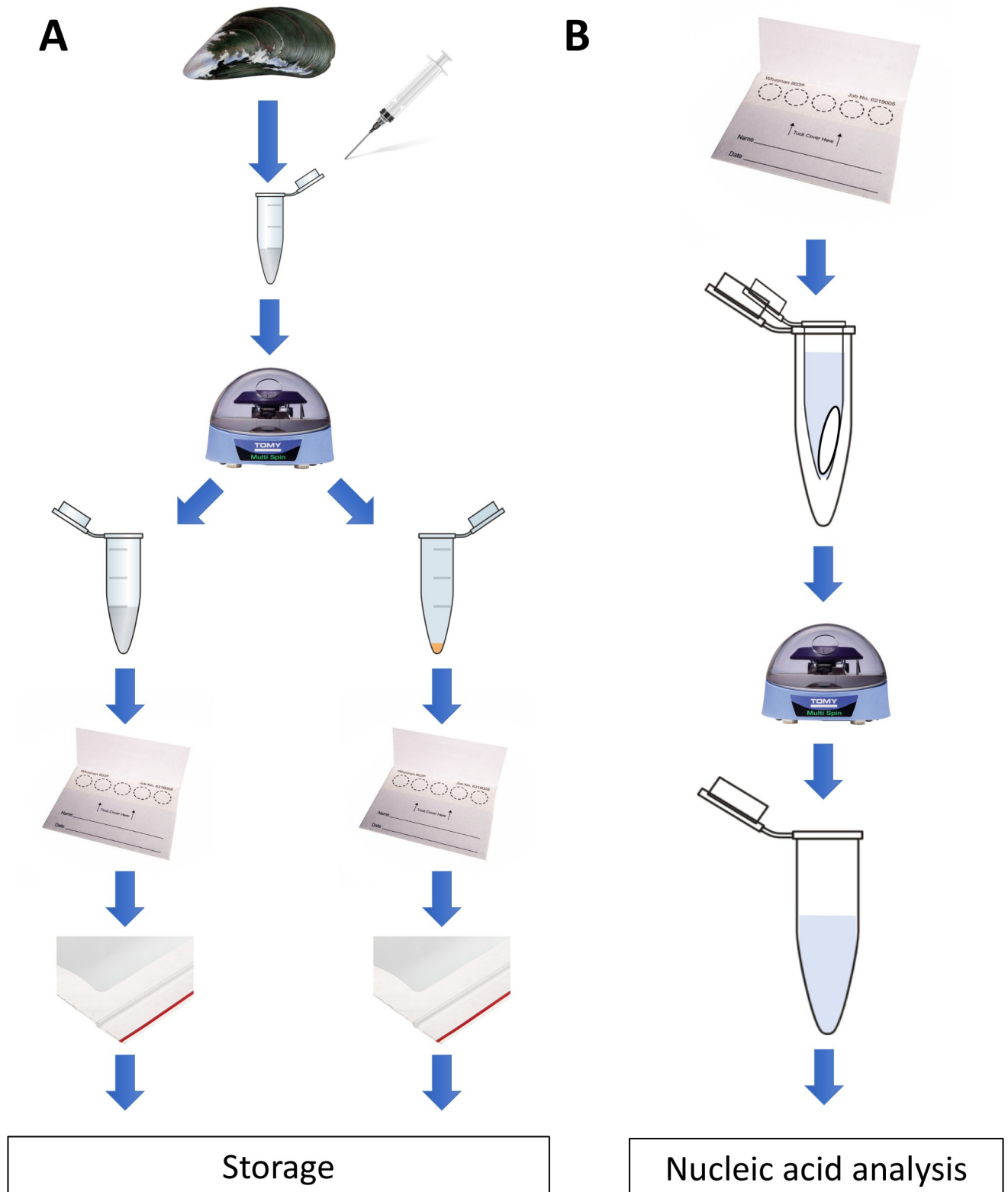


Fig 1. Diagrammatic summary of the sampling protocol. *Left*, for routine preparation of liquid biopsies on FTA cards, hemolymph was withdrawn from the adductor muscle. Samples (approx. 1ml of hemolymph) were immediately transferred into sterile 1.5 ml and centrifuged at room temperature using a

battery-powered mini-centrifuge (TOMY, Japan). After centrifugation, aliquots (50 μ l) of supernatants were spotted on individual discs (10 mm diameter) on FTA® cards. The remaining supernatant was discarded and hemocyte pellets gently resuspended and spotted on FTA cards. The cards were dried for 15 min at room temperature and stored individually in small plastic Ziploc baggies containing a silica gel desiccant moisture absorber. *Right*, to recover nucleic acids, discs were carefully placed at the bottom of a sterile microcentrifuge tube with a hole punctured in its bottom. The tube was then transferred into a larger sterile microcentrifuge tube before isolation of nucleic acids as described in details in the material and methods section.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223525.g001>

QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen). qPCRs were amplified using the following conditions: 95°C for 5 min, followed by 40 cycles at 95°C for 10 s and 60°C for 30 s with a single acquisition. A final melting curve analysis was performed using at 95°C for 5 s, 65°C for 60 s and 97°C with a continuous acquisition. To ensure primer specificity, melting temperature curves were determined for each amplicon. PCR products were run on a 1.5% agarose gel to visualize the bands and ensure a unique band is amplified. The expression level (\log_2 of the fold change) was expressed 1) calculating the delta CT (Δ CT) by subtracting the averaged threshold cycle (CT) value of the three housekeeping genes (*EF1 γ* , *EF1 α* and *SNX14*) from the CT value of the target gene and 2) comparing the fold change of non-exposed mussels versus thermal-exposed mussels [22].

Taxonomic analysis of hemolymph microbiota

Following fixation on FTA cards, DNA was extracted from hemocyte pellets, as described above. The whole 16S bacterial DNA V2-V3 region was targeted by the primers 28F-519R primers and pyrosequenced by the Illumina Mi-Seq Next Generation Sequencer at Research & Testing Laboratory (<http://www.researchandtesting.com/>, Texas, USA). A detailed description of bioinformatic filters that were used for analysis can be found at http://www.rtlgenomics.com/docs/Data_Analysis_Methodology.pdf. Briefly, post-sequencing processing of the raw data for both types of samples (frozen and FTA-fixed cell pellets) was carried out by standard methods to eliminate low quality readings, contaminants and chimeras. The remaining filtered sequences were then grouped into Operational Taxonomy Units (OTUs) at a similarity level \geq 95%. For each sample, we have obtained approximately 10 000–20 000 OTUs. For taxonomic classification, we used the Ribosomal Database Project (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu/>). The metagenomic data from this publication have been deposited to the NCBI Sequence Read Archives with the assigned the identifier PRJNA564645. To take into account the problem of contamination, we used, as controls, template-free FTA cards that were processed with the same DNA extraction and PCR amplification kits as the real samples, as previously recommended [23].

Statistics

All datasets were validated for normality (with Shapiro-Wilk test) and homoscedasticity (with Bartlett and F of Fisher test). Student's t-test was used as parametric test to compare data set with two groups and a two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare datasets with more than two groups. For non-parametric data, Kruskal Wallis test was used to

Table 1. List of primers used in this study.

Gene	Sense primers	Antisense primers	Product size
<i>EF1γ</i>	5' -AAA GCT CAA ATT GCA GCG GA-3'	5' -ATG cAA TCT cCT CCA GCT GT-3'	158 bp
<i>SXN14</i>	5' -AGA GGC GAG GAT CAG ATG TG-3'	5' -ATC TTC ACC ACC ACC AGA GG-3'	158 bp
<i>HSP70</i>	5' -ACA GAG AGA CTT GTT GGC GA-3'	5' -TTC CGA TCA GTC TCT TGG CA-3'	88 bp
<i>SOD</i>	5' -ACC ATG TGC GTC TAC AGG AT-3'	5' -TTG ATC AGG TTT CCG ATG GC-3'	95 bp

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223525.t001>

compare datasets. All data are expressed as the mean \pm S.D. Results were considered statistically significant at $P \leq 0.05$.

Results

Isolation and analysis of RNA from hemocyte pellets fixed on FTA cards

Because hemocytes are implicated in several physiological functions, such as phagocytosis of pathogens, homeostasis, and reproduction, there is increasing interest in studying how their transcriptome is modulated by environmental stress factors [24–28]. We thus developed a general framework procedure for collecting hemolymph samples using FTA cards without the need of a cold chain is shown and detailed in Fig 1A. Other than a battery-operated centrifuge, it does not require specialized equipment and can be easily incorporated into a small, light-weight portable unit (S1 Fig).

To test whether such sampling framework is compatible for multi-omics analysis of hemolymph samples, we first compared RNA yields obtained from frozen hemocytes and hemocytes that were fixed on FTA cards. Isolation of RNA from FTA discs was carried out using a simple TRIzol-based protocol which consisted of soaking FTA discs in TRIzol for 10 min at room temperature (Fig 1B). Nucleic acids were then eluted from the discs by brief centrifugation and RNA purified using standard phase separation with chloroform and subsequent precipitation with isopropyl alcohol [29]. Our results showed that similar amount of RNA was recovered from pellets fixed on FTA discs as compared to pellets frozen at -20°C (Fig 2A). Both methods yielded similar ratio of the absorbance at 260 and 280 nm. RNA recovery from FTA discs could also be achieved using a commonly-used silica-based RNA extraction kit, which resulted in lower yield compared to the TRIzol-based method but provided purer RNA (Fig 2B). We also found that the RNA yield from hemocyte pellets fixed on FTA was not significantly affected by long term storage (up to 6 months) at 4°C or ambient temperatures (Fig 2C). We next compared the performance RT-qPCR carried out using frozen RNA and RNA fixed on FTA cards and found that both conservation methods performed equally when measuring expression of three commonly used housekeeping genes (*EF1 α* , *EF1 γ* , and *SNX14*) (Fig 3A). Both methods were also equally efficient measuring the *de novo* expression of stress-related genes (*Hsp70* and *SOD*) in hemocytes collected from mussels subjected to an acute thermal stress (Fig 3B).

Bacterial microbiome analysis

Bacteria microbiome-derived profiles are emerging as potent biomarkers not only in the biomedical field, but also in monitoring environmental stress in a vast number of species, including marine organisms [30, 31]. For these experiments, we compared the 16SrDNA gene-based bacterial profiles from frozen and FTA-conserved DNA from cellular pellets. Our results showed that both methods generated similar bacterial profiles with regards to phylum (Fig 4A). We found no significant differences in genus-level bacterial groups that were most frequently found in hemolymph (Fig 4B). The most common bacteria found in the hemolymph was from the genus *Colwellia*. This genus is commonly found in marine habitats, including the hemolymph of blue mussels [18]. Taken together, these findings show that FTA-fixed DNA is perfectly compatible with metagenomic analysis of circulating microbiota.

Circulating cell-free DNA

Analysis of ccfDNA from liquid biopsies is another promising avenue for the development of predictive biomarkers. In humans, it serves as a genomic reservoir that is easily accessible with

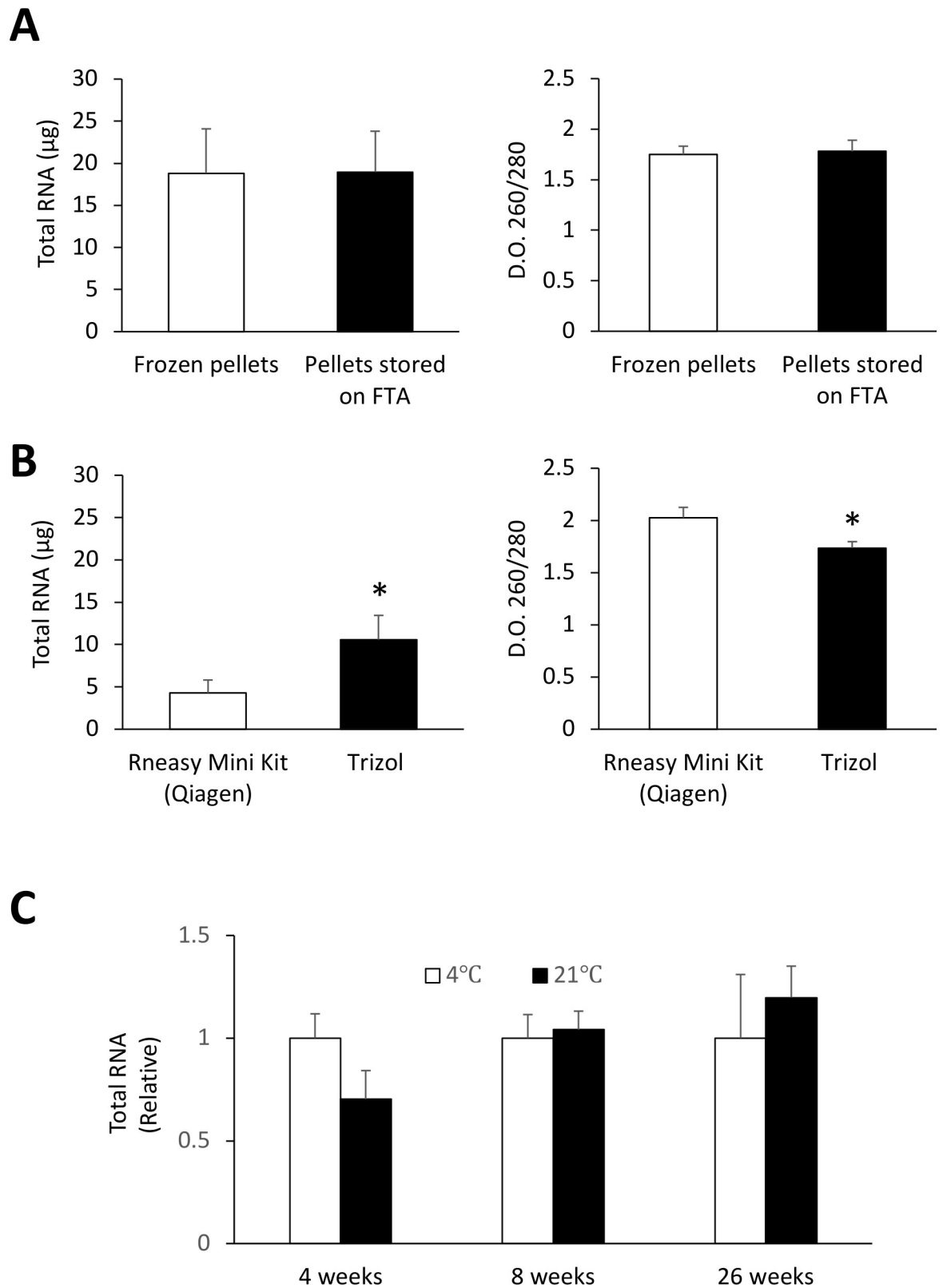


Fig 2. RNA extraction from FTA cards. (A) Recovery of total RNA from hemocytes stored frozen at -20°C or on FTA cards using a TRIzol-based protocol. (B) Comparative RNA recovery from FTA cards using TRIzol or the RNeasy kit. (C) Stability of RNA fixed on FTA cards and kept at different temperatures. * $p < 0.05$. Values are expressed as the total amount of RNA recovered from a 10 mm diameter sample disc FTA cards.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223525.g002>

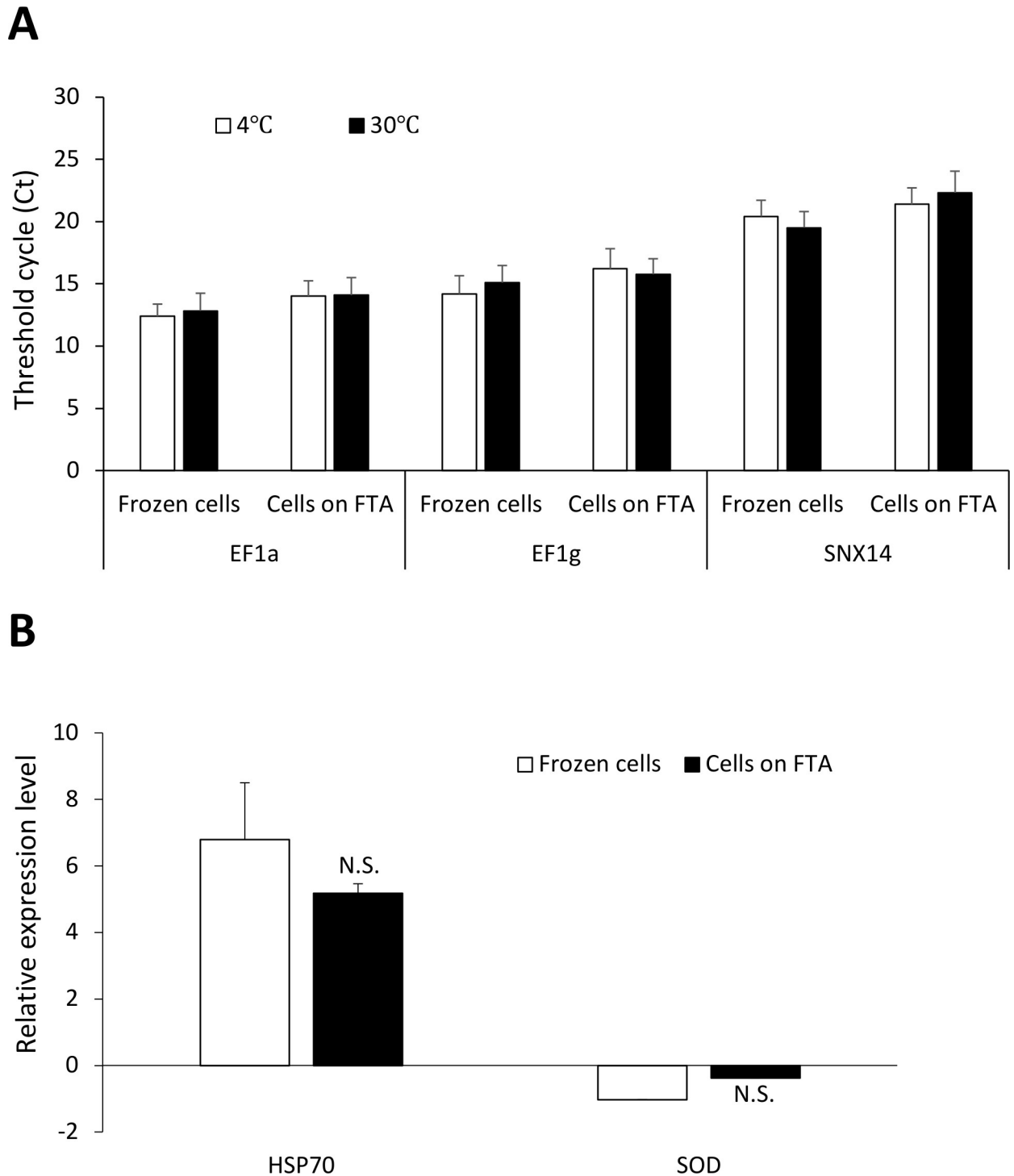


Fig 3. RT-qPCR analysis using frozen and FTA-fixed RNA. (A) Cycle thresholds (Ct) values obtained for expression analysis of three housekeeping genes in pooled hemocytes pellets that were either kept frozen or fixed on FTA cards. (B) Relative gene expression of *Hsp70* and superoxide dismutase (*SOD*) in hemocytes following an acute thermal stress at 30°C for 30 min. Expression levels are relative to controls (4°C). No significant (N.S.) differences were found using both methods.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223525.g003>

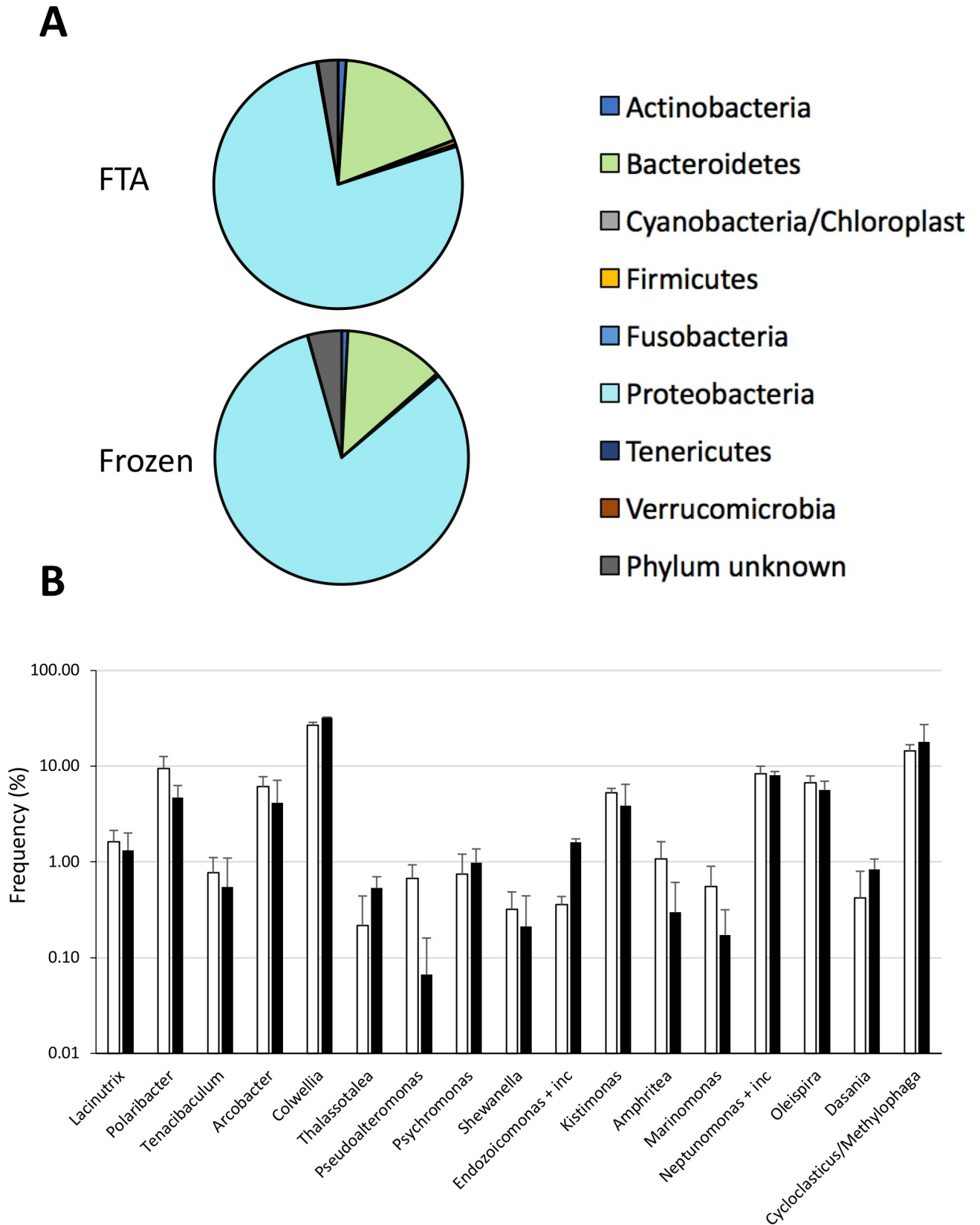


Fig 4. Bacterial profiles of hemolymph. Upper histogram, pie chart representation of the relative abundance (in percentage) of 16S rRNA of the most common phyla found in liquid biopsies of *M. edulis*. Lower histogram, bacterial species differentially abundant in frozen and FTA-fixed liquid biopsies.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223525.g004>

Table 2. Concentrations of ccfDNA.

Samples	ccfDNA (ng/mL)
Human plasma	8,72 ± 1,43
<i>M. edulis</i>	4,23 ± 0,18

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223525.t002>

a minimally-invasive procedure. To our knowledge, however, the existence of ccfDNA in hemolymph of invertebrates, and in mussels in particular, has not been reported. Using the same method that is commonly used for isolating ccfDNA (see [material and methods](#) section for details) from human plasma, we have thus investigated the presence of ccfDNA in mussels. Our results revealed that we indeed found ccfDNA in hemolymph of *Mytilus edulis* (**Table 2**) at a range of concentrations (nanograms/ml) that were similar to that found in humans [32]. Similar results were obtained for *M. desolationis* and *Aulacomya ater* (*A. ater*). To validate the integrity of the ccfDNA fragments in liquid biopsies (cell-free hemolymph) fixed on FTA cards, we carried out real-time qPCR analysis using primers that generated small amplicons and that were specific for *EF1γ*, *HSP70* and *SNX14* genes [33] (**Table 3**). Our results showed that we could indeed find evidence of ccfDNA fragments encoding *SNX14* and *HSP70* genes but not *EF1γ*, suggesting that ccfDNA fragments are generated in a gene-specific manner, as observed in humans (**Table 3**). Indeed, ccfDNA fragments have been shown to derive from cell-specific nucleosome footprinting from different cell types [13]. These results reveal for the first time the presence of ccfDNA in mussels and open the door for its use as a biomarker in liquid biopsies collected from mussels.

Discussion

Given the growing concerns over the anthropogenic impact on marine ecosystems, it is increasingly critical to develop biomarkers that can be used as diagnostic and predictive tools, as well as for monitoring the success of the remediation efforts. The use of multi-omics biomarkers is a step in that direction. It obliges us, however, to go back to the drawing board to re-examine our sampling strategy not only for logistical reasons, but for economical reasons as well. This is particularly true for polar regions where the logistic complexity of tissue sampling is a major obstacle. In the present work, we have combined the use of FTA cards and the concept of liquid biopsies for the development of novel omics-based biomarkers in mussels, a widely used sentinel species. More specifically, we have shown that: 1) hemocytes pellets can be readily fixed on FTA cards and used for gene expression analysis; 2) FTA-fixed cell pellets are stable for long term periods when stored at room temperature, facilitating the biobanking activities and shipment to third parties at lower cost when compared to frozen samples; 3) our sampling strategy is easily adaptable for microbiome analysis of bacterial profiles, and 4) ccfDNA is present in mussel hemolymph and can be used as a genomic reservoir for the development of novel biomarkers. Taken together, this study lays the foundation for a logistically-friendly, omics-based multi-biomarker approach using mussels to assess the quality of marine ecosystems.

Until now, the concept of liquid biopsies has been almost exclusively used for guiding clinical practice, especially in oncology, prenatal screening, transplantation and presence of non-human ccfDNA (virus-derived sequences, for example) [12, 34, 35]. One of the main benefits of non-invasive liquid biopsies is that it overcomes many of the drawbacks associated with tissue biopsies. It also provides an accurate snapshot of the genomic landscape, bypassing many problems associated with tissue heterogeneity. In fact, to our knowledge, this is the first report of the presence of ccfDNA in invertebrates. In humans, the normal plasma concentration of

Table 3. qPCR analysis of ccfDNA fixed on FTA cards.

Gene	Template	CT	MT	% of detection
EF1 γ	ccfDNA	25,31 \pm 0,85	78,50 \pm 1,71	0%
	NTC	25,79 \pm 0,67	79,65 \pm 0,21	
SNX14	ccfDNA	24,64 \pm 2,44*	83,84 \pm 0,47	56%
	NTC	31,79 \pm 0.01	N.D.	
HSP70	ccfDNA	21,25 \pm 1,55 *	81,51 \pm 0,14 *	89%
	NTC	32,16 \pm 0	80 \pm 0	

NTC, No template control. CT, threshold cycle, MT, melting temperature, and % of amplicon detection obtained for EF1 γ , SNX14 and HSP70 (n = 9 mussels, with 3 replicates for each sample. ND = no detected.

* $p < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223525.t003>

ccfDNA is generally below 10–20 ng/ml, which is relatively similar to what we found in hemolymph of mussels. While it can increase by 5–10 times in patients with malignant disease or stress conditions [36]. Future studies will be needed to determine whether measuring ccfDNA levels in mussels can be used as a rapid stress biomarker as it does in humans [32, 36, 37]. Analysis of ccfDNA is also perfectly adaptable for serial samplings of DNA abnormalities, gene expression analysis, point mutations, chromosome translocations, miRegulome, epigenetic changes, etc. For example, analysis of ccfDNA can theoretically be used for measuring mutations in genes associated with hematopoietic neoplasia (such as *p53*), for rapid identification of mussel species, or for any genomic traits. It could also be used to detect the presence of parasitic and viral DNA to reduce the risk for public human health. From an ethical point of view, it reduces incidental mortality associated with conventional tissue biopsies. To develop the full potential of this approach, we are currently using next-generation sequencing to perform a genomic analysis of the entire ccfDNA found in different mussel populations. The results of these analyses will be reported in a separate manuscript.

Another benefit of combining both FTA-based technology and liquid biopsy is its compatibility with microbiome analysis. In humans, although blood is normally considered a sterile environment, there is increasing studies showing the circulating cells harbor a rich bacterial microbiome that can be used as disease biomarkers [38, 39]. This is also true for bivalves. The microbiome of hemolymph samples collected from the adductor muscle from Pacific oysters, for example, has been shown to undergo significant changes following abiotic and biotic stress factors [40]. A recent study showing that bacterial diversity and richness in mussels were higher in the hemolymph compared to other tissues support the idea that liquid biopsies is a valid approach for microbiome analysis in mussels [18]. Indeed, Vezzulli and colleagues have shown that the alpha diversity of the microbiome of blue mussels was higher in the hemolymph compared to the digestive gland, in both [18]. Our results further showed that the bacterial profiles obtained from DNA of cells fixed on FTA was not significantly different from that obtained from frozen cells (S2 Fig). We found no significant differences in those bacteria that are commonly found in marine ecosystems, such as *Alteromonadales* or *Oceanospirillales* [41, 42]. In fact, our results showed that DNA from cells fixed on FTA cards was more prone to detect those rare bacterial DNA, consistent with the ability of the chemical matrix of FTA cards to stabilize and protect nucleic acids from environmental degradation. Not surprisingly, one of the most abundant bacterial DNA that we found in both FTA cards and frozen samples derived from the *Polaribacter* genus, which species are almost always found in polar or marine environments [43]. The other most frequently found genus were *Colwellia*, *Oleispira*, *Cycloclasticus* and *Neptunomonas*. These bacteria are well known to degrade polycyclic aromatic

hydrocarbons (PAH) or short-chain alkanes. *Cycloclasticus* bacterial DNA has been recently found in *Bathymodiolus heckeriae* mussels where they have established a symbiosis at a 3000m depth in oil-rich habitats near asphalt volcanoes in the Gulf of Mexico [44]. They have also been shown to bloom in marine habitats following the Deep Horizon oil spill [44]. Interestingly, the *Oleispira* genus, another bacterium that has bloomed following the Deep Horizon oil spill, was also among the most frequently found bacterium in *M. edulis*. The third most frequent bacteria found was from the genus *Neptunomonas*, another bacterium implicated in degradation of PAHs and normally found in contaminated sediments [45]. Whether the presence of this microbiota reflects a symbiotic relationship with *M. edulis* is unclear at the present time. Overall, our findings indicate that microbiome analysis in liquid biopsies collected from cellular pellets of mussels is an interesting avenue to study dysbiosis in mussels following exposure to environmental stress.

Our study showed that combining liquid biopsies and the FTA technology could be useful for long-term biobanking and retesting of omics biomarkers collected from sentinel mussels, particularly in remote regions. This approach is also economically viable, especially when using the Whatman 903™ FTA cards. Although we have used for this study 10 mm diameter circular FTA discs, we obtained similar RNA yield using smaller discs (S3 Fig). If necessary, one could use the the Whatman FTA Gene Cards, which have been adapted for capture on nucleic acids. Although more expensive than regular Whatman 903™ cards, we found that they are more performant for DNA recovery (S4 Fig). It is important to note, however, that there are multiple options for isolating nucleic acid from FTA cards. In our hands, we have found that TRIzol was an adequate, low cost, and versatile method for routine RT-qPCR analysis. It can also be combined with commercial kits to obtain purer RNA preparations (S1 Table). TRIzol is also suitable for isolation of small RNAs (<200 nucleotides) as compared to the silica-based methods which do not retain small RNAs [46]. This has to be taken into consideration for future studies aimed at testing the possibility of using non-coding RNAs as putative biomarkers in hemolymph of mussels. In humans, non-coding RNAs have shown great promise as potential cancer biomarkers for liquid biopsies.

Another clear benefit of combining liquid biopsy and the FTA technology is from a logistically-point of view. We can now collect samples at remote site with a minimal amount of equipment (S1 Fig). Moreover, this approach addresses increasing concerns in field work ethics [47]. Liquid biopsies require sampling of a very small volume of hemolymph and does not lead to animal death. We believe that such approach could also be extended to other marine and freshwater organisms and offers many advantages for the development of long-term ecological observatories in polar regions threatened by anthropogenic activities.

Supporting information

S1 Fig. Portable laboratory carrying case used for liquid biopsy sampling. The case contains a battery powered minicentrifuge and a portable solar panel battery charger for long term expeditions. The case also contains all necessary reagents and equipment to collect biopsies on site.

(TIFF)

S2 Fig. Relative abundance of order-level bacteria in frozen and FTA-fixed liquid biopsies. Data are shown as mean \pm SD from duplicates.

(TIFF)

S3 Fig. RNA extraction from FTA cards. (A) Recovery of total RNA from a 10 mm disc (100%) and a quarter of a disc (25%). (B) RNA recovery following soaking for 10 min versus

overnight at room temperature before centrifugation. Results are representative of two independent experiments. RNA recovery was carried out using the TRIzol-based method. (TIFF)

S4 Fig. Comparative analysis of the performance of two different types of FTA cards. DNA recovery from hemocyte pellets that were fixed on the Whatman 903™ cards or the Whatman Gene FTA cards. Values are expressed as the total amount of DNA recovered from a 3 mm diameter sample disc using the PropGEM-based protocol. Results are representative of two independent experiments (n = 12/fgroup). * $p < 0.05$. (TIFF)

S1 Table. RT-qPCR analysis of RNA extracted from frozen or FTA-fixed cell pellets. (DOCX)

Acknowledgments

The authors would like to thank Ms. Marlène Fortier for her technical help, all the personnel from the French Polar Institute Paul Emile Victor (IPEV) and the Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF) for their help and hospitality during our stay in the Kerguelen archipelago.

Author Contributions

Conceptualization: France Caza, Philippine Granger Joly de Boissel, Stéphane Betoulle, Yves St-Pierre.

Formal analysis: France Caza, Philippine Granger Joly de Boissel, Richard Villemur.

Funding acquisition: Stéphane Betoulle, Yves St-Pierre.

Investigation: France Caza, Philippine Granger Joly de Boissel, Stéphane Betoulle, Yves St-Pierre.

Methodology: France Caza, Philippine Granger Joly de Boissel, Stéphane Betoulle, Yves St-Pierre.

Project administration: Yves St-Pierre.

Resources: Stéphane Betoulle, Yves St-Pierre.

Supervision: Yves St-Pierre.

Validation: France Caza, Philippine Granger Joly de Boissel.

Writing – original draft: Yves St-Pierre.

Writing – review & editing: France Caza, Philippine Granger Joly de Boissel, Richard Villemur, Stéphane Betoulle.

References

1. Beyer J, Green NW, Brooks S, Allan IJ, Ruus A, Gomes T, et al. Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: a review. *Marine environmental research*. 2017 Sep 1; 130:338–65. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.07.024> PMID: 28802590
2. Bodin N, Burgeot T, Stanisiere JY, Bocquené G, Menard D, Minier C, et al. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2004 Aug 1; 138(4):411–27.

3. Dondero F, Dagnino A, Jonsson H, Capri F, Gastaldi L, Viarengo A. Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (*Mytilus edulis*) using a combined biomarker/gene expression approach. *Aquatic Toxicology*. 2006 Jun 1; 78:S13–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.025> PMID: 16644027
4. Farcy E, Burgeot T, Haberkorn H, Auffret M, Lagadic L, Allenou JP, et al. An integrated environmental approach to investigate biomarker fluctuations in the blue mussel *Mytilus edulis* L. in the Vilaine estuary, France. *Environmental Science and Pollution Research*. 2013 Feb 1; 20(2):630–50. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1316-z> PMID: 23247516
5. Berg DJ, Haag WR, Guttman SI, Sickel JB. Mantle biopsy: a technique for nondestructive tissue-sampling of freshwater mussels. *Journal of the North American Benthological Society*. 1995 Dec 1; 14(4):577–81.
6. Mioduchowska M, Kaczmarczyk A, Zając K, Zając T, Sell J. Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in somatic tissues of the endangered freshwater mussel *Unio crassus* (Bivalvia: Unionidae): implications for sex identification and phylogeographical studies. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 2016 Nov; 325(9):610–25.
7. Lacoursière-Roussel A, Howland K, Normandeau E, Grey EK, Archambault P, Deiner K, et al. eDNA metabarcoding as a new surveillance approach for coastal Arctic biodiversity. *Ecology and evolution*. 2018 Aug; 8(16):7763–77. <https://doi.org/10.1002/ece3.4213> PMID: 30250661
8. da Cunha Santos G. FTA Cards for Preservation of Nucleic Acids for Molecular Assays: A Review on the Use of Cytologic/Tissue Samples. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2018 Mar; 142(3):308–12.
9. Muthukrishnan M, Singanallur NB, Ralla K, Villuppanoor SA. Evaluation of FTA® cards as a laboratory and field sampling device for the detection of foot-and-mouth disease virus and serotyping by RT-PCR and real-time RT-PCR. *Journal of virological methods*. 2008 Aug 1; 151(2):311–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.05.020> PMID: 18584888
10. Liang X, Chigerwe M, Hietala SK, Crossley BM. Evaluation of Fast Technology Analysis (FTA) Cards as an improved method for specimen collection and shipment targeting viruses associated with Bovine Respiratory Disease Complex. *Journal of virological methods*. 2014 Jun 15; 202:69–72. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.02.022> PMID: 24657552
11. Tam KI, Esona MD, Williams A, Ndze VN, Boula A, Bowen MD. Evaluation of BBL™ Sensi-Discs™ and FTA® cards as sampling devices for detection of rotavirus in stool samples. *Journal of virological methods*. 2015 Sep 15; 222:41–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.05.007> PMID: 26022083
12. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 Oct 21; 105(42):16266–71.
13. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell*. 2016 Jan 14; 164(1–2):57–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.050> PMID: 26771485
14. Gilbert JA, Quinn RA, Debelius J, Xu ZZ, Morton J, Garg N, et al. Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature*. 2016 Jul; 535(7610):94. <https://doi.org/10.1038/nature18850> PMID: 27383984
15. Guglielmi G. How gut microbes are joining the fight against cancer. *Nature*. 2018 May; 557(7706):482. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05208-8> PMID: 29795257
16. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpnits TV, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018 Jan 5; 359(6371):97–103. <https://doi.org/10.1126/science.aan4236> PMID: 29097493
17. Apprill A. Marine animal microbiomes: toward understanding host–microbiome interactions in a changing ocean. *Frontiers in Marine Science*. 2017 Jul 18; 4:222.
18. Vezzulli L, Stagnaro L, Grande C, Tassistro G, Canesi L, Pruzzo C. Comparative 16S rDNA gene-based microbiota profiles of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a shellfish farm (Ligurian Sea, Italy). *Microbial ecology*. 2018 Feb 1; 75(2):495–504. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1051-6> PMID: 28803409
19. Caza F, Betoulle S, Auffret M, Brousseau P, Fournier M, St-Pierre Y. Comparative analysis of hemocyte properties from *Mytilus edulis* desolationis and *Aulacomya ater* in the Kerguelen Islands. *Marine environmental research*. 2015 Sep 1; 110:174–82. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.09.003> PMID: 26382607
20. Gustafson LL, Stoskopf MK, Bogan AE, Showers W, Kwak TJ, Hanlon S, et al. Evaluation of a nonlethal technique for hemolymph collection in *Elliptio complanata*, a freshwater bivalve (Mollusca: Unionidae). *Diseases of aquatic organisms*. 2005 Jun 30; 65(2):159–65. <https://doi.org/10.3354/dao065159> PMID: 16060269

21. Chiminqgi M, Moutereau S, Pernet P, Conti M, Barbu V, Lemant J, et al. Specific real-time PCR vs. fluorescent dyes for serum free DNA quantification. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*. 2007 Aug 1; 45(8):993–5.
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*. 2001 Dec 1; 25(4):402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262> PMID: 11846609
23. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC biology*. 2014 Dec; 12(1):87.
24. Tanguy M, McKenna P, Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Danger JM, Siah A. Sequence analysis of a normalized cDNA library of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* LGP32 strain. *Results in immunology*. 2013 Jan 1; 3:40–50. <https://doi.org/10.1016/j.rinim.2013.04.001> PMID: 24600557
25. Moreira R, Pereiro P, Canchaya C, Posada D, Figueras A, Novoa B. RNA-Seq in *Mytilus galloprovincialis*: comparative transcriptomics and expression profiles among different tissues. *BMC genomics*. 2015 Dec; 16(1):728.
26. Detree C, Núñez-Acuña G, Roberts S, Gallardo-Escárate C. Uncovering the complex transcriptome response of *Mytilus chilensis* against saxitoxin: implications of harmful algal blooms on mussel populations. *PloS one*. 2016 Oct 20; 11(10):e0165231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165231> PMID: 27764234
27. Dong W, Chen Y, Lu W, Wu B, Qi P. Transcriptome analysis of *Mytilus coruscus* hemocytes in response to *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish & shellfish immunology*. 2017 Nov 1; 70:560–7.
28. de Boissel PG, Fournier M, Rodriguez-Lecompte JC, McKenna P, Kibenge F, Siah A. Functional and molecular responses of the blue mussel *Mytilus edulis*' hemocytes exposed to cadmium-An in vitro model and transcriptomic approach. *Fish & shellfish immunology*. 2017 Aug 1; 67:575–85.
29. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols*. 2006 Aug; 1(2):581. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83> PMID: 17406285
30. Bourlat SJ, Borja A, Gilbert J, Taylor MI, Davies N, Weisberg SB, et al. Genomics in marine monitoring: new opportunities for assessing marine health status. *Marine pollution bulletin*. 2013 Sep 15; 74(1):19–31. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.05.042> PMID: 23806673
31. Carugati L, Corinaldesi C, Dell'Anno A, Danovaro R. Metagenetic tools for the census of marine meiofaunal biodiversity: an overview. *Marine Genomics*. 2015 Dec 1; 24:11–20. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2015.04.010> PMID: 25957694
32. Dawson SJ. Characterizing the Cancer Genome in Blood. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018 May 29:a026880.
33. Cubero-Leon E, Ciocan CM, Minier C, Rotchell JM. Reference gene selection for qPCR in mussel, *Mytilus edulis*, during gametogenesis and exogenous estrogen exposure. *Environmental Science and Pollution Research*. 2012 Aug 1; 19(7):2728–33.
34. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology*. 2014 Feb 20; 32(6):579. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2011> PMID: 24449238
35. De Vlaminck I, Martin L, Kertesz M, Patel K, Kowarsky M, Strehl C, et al. Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015 Oct 27; 112(43):13336–41.
36. Huttunen R, Kuparinen T, Jylhävä J, Aittoniemi J, Vuento R, Huhtala H, et al. Fatal outcome in bacteremia is characterized by high plasma cell free DNA concentration and apoptotic DNA fragmentation: a prospective cohort study. *PloS one*. 2011 Jul 1; 6(7):e21700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021700> PMID: 21747948
37. Forsblom E, Aittoniemi J, Ruotsalainen E, Helmijoki V, Huttunen R, Jylhävä J, et al. High cell-free DNA predicts fatal outcome among *Staphylococcus aureus* bacteraemia patients with intensive care unit treatment. *PloS one*. 2014 Feb 10; 9(2):e87741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087741> PMID: 24520336
38. Potgieter M, Bester J, Kell DB, Pretorius E. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS microbiology reviews*. 2015 May 4; 39(4):567–91. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv013> PMID: 25940667
39. Qian Y, Yang X, Xu S, Wu C, Qin N, Chen SD, et al. Detection of Microbial 16S rRNA Gene in the Blood of Patients With Parkinson's Disease. *Frontiers in aging neuroscience*. 2018;10.
40. Lokmer A, Wegner KM. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *The ISME journal*. 2015 Mar; 9(3):670. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.160> PMID: 25180968

41. Evans FF, Egan S, Kjelleberg S. Ecology of type II secretion in marine gammaproteobacteria. *Environmental microbiology*. 2008 May; 10(5):1101–7. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01545.x> PMID: 18218035
42. Jensen S, Duperron S, Birkeland NK, Hovland M. Intracellular Oceanospirillales bacteria inhabit gills of *Acesta bivalves*. *FEMS microbiology ecology*. 2010 Dec 1; 74(3):523–33. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00981.x> PMID: 21044098
43. Gosink JJ, Woese CR, Staley JT. *Polaribacter* gen. nov., with three new species, *P. irgensii* sp. nov., *P. franzmannii* sp. nov. and *P. filamentus* sp. nov., gas vacuolate polar marine bacteria of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides group and reclassification of '*Flectobacillus glomeratus*' as *Polaribacter glomeratus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1998 Jan 1; 48(1):223–35.
44. Rubin-Blum M, Antony CP, Borowski C, Sayavedra L, Pape T, Sahling H, et al. Short-chain alkanes fuel mussel and sponge *Cycloclasticus* symbionts from deep-sea gas and oil seeps. *Nature microbiology*. 2017 Aug; 2(8):17093.
45. Hedlund BP, Geiselbrecht AD, Bair TJ, Staley JT. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999 Jan 1; 65(1):251–9. PMID: 9872786
46. Sultan M, Amstislavskiy V, Risch T, Schuette M, Dökel S, Ralser M, et al. Influence of RNA extraction methods and library selection schemes on RNA-seq data. *BMC genomics*. 2014 Dec; 15(1):675.
47. Costello M, Beard KH, Corlett RT, Cumming GS, Devictor V, Loyola R, et al. 2016. Field work ethics in biological research.

CHAPITRE V

8.DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Au tout début de mon doctorat, nous cherchions des biomarqueurs permettant de détecter les changements induits par les polluants et le réchauffement global dans les écosystèmes marins côtiers de Kerguelen en utilisant la moule comme espèce sentinelle. Pour ce faire, nous avons utilisé des biomarqueurs fonctionnels et moléculaires traditionnels de la réponse hémostatique suite à une exposition au cadmium et à un stress de température. Ces études ont été effectuées chez deux espèces de moules qui cohabitent dans les mêmes moulières de Kerguelen. Nous avons porté une attention particulière à la moule striée, une espèce encore peu connue comparativement à la moule bleue. Bien que nos premières études utilisant les tests de phagocytose et de sensibilité à l'apoptose aient permis de mettre en évidence des différences fondamentales dans les réponses chez les deux espèces de moules, la lourdeur logistique (*e.g.* chaîne de froid au Kerguelen) et les problèmes de standardisation ont rendu difficile l'utilisation de ces biomarqueurs pour le suivi à long terme des effets des CC sur la santé des moules. Il était donc impératif de revoir nos approches. Les résultats les plus prometteurs sont venus des analyses des métadonnées générées à partir d'approches basées sur le séquençage à haut débit. La suite de mon projet a été consacrée au développement d'une méthode d'échantillonnage logistiquement simple et compatible avec l'utilisation de métadonnées pour des études en régions éloignées. Globalement, cette thèse a permis d'établir des fondations solides pour le développement de nouvelles générations de biomarqueurs pour la mise en place d'observatoires visant à évaluer l'état de santé des écosystèmes marins côtiers en utilisant la moule comme espèce sentinelle.

8.1 Comparatif de la réponse hémostatique entre les deux espèces

Dans la première partie du projet, nous avons démontré que : 1) l'activité phagocytaire des hémostates des deux espèces de moules était comparable, tant au niveau de base qu'en réponse à des changements de salinité et/ou de température ou d'exposition à des concentrations croissantes de cadmium; 2) les hémostates de *A. atra* montrent toutefois une plus grande sensibilité que ceux de la moule bleue face à un stress thermique combiné à l'exposition au cadmium; 3) l'utilisation de sondes Yo-Pro et l'Annexin V a permis de démontrer que les

hémocytes des deux espèces semblent posséder des différences fondamentales au niveau des mécanismes apoptotiques. L'ensemble de ces résultats représentent une première comparaison physiologique entre deux espèces de bivalves provenant de la même moulière plus particulièrement *A. atra*, une espèce de moules peu étudiée jusqu'à maintenant et que l'on retrouve uniquement dans l'hémisphère Sud. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que cette espèce est menacée par la présence de plus en plus omniprésente de la moule bleue (Caza et al 2016). La plupart des études chez les bivalves qui ont tenté d'établir un lien entre temps d'exposition, l'espèce étudiée et le stresser ont utilisé la moule bleue comme espèce sentinelle (Matozzo 2016), d'où l'intérêt de comparer deux espèces de moules vivant dans les mêmes conditions environnementales. Nos études avec des variations de facteurs abiotiques ont également démontré que les hémocytes de ces deux espèces semblaient avoir une grande capacité d'adaptation puisque les variations de salinité de 16 à 38 ppt n'ont démontré aucun effet détectable sur la phagocytose et qu'il fallait pousser les températures à 30°C pour voir un changement significatif au niveau des hémocytes d'*A. atra*. Ces effets étaient plus marqués en combinant le cadmium, illustrant l'importance de combiner plusieurs stresser dans de telles analyses comparatives afin de bien connaître les espèces sentinelles étudiées et d'approfondir les mécanismes de régulation de la réponse hémocytaire. Étant donné la différence de mécanisme d'apoptose que nous avons observée entre les deux espèces de moules, il sera intéressant d'en connaître les mécanismes sous-jacents, notamment en ce qui a trait à la composition de la membrane cellulaire.

8.2 Le relargage externe d'hémocytes face au stress thermique.

Durant notre première campagne à Kerguelen, nous avons constaté que des hémocytes étaient présents dans le liquide intervalvaire. Ce résultat est hautement original car il n'a jamais été rapporté dans la littérature. En fait, nous avons démontré la présence d'hémocytes viables et fonctionnels en nombre significatif dans le liquide intervalvaire après un stress thermique. Cet effet était particulièrement observable chez *A. atra* comparativement à *M. desolationis*. Également, nos résultats ont mis en évidence un relargage dans l'eau de mer des hémocytes viables et fonctionnellement compétents (du moins au niveau de la phagocytose), en plus de démontrer que les hémocytes libérés dans l'eau de mer peuvent entrer dans la circulation hémolymphocytaire ainsi que dans le liquide intervalvaire d'une moule hôte. Finalement, nous

avons mis en évidence que ce mécanisme de recapture d'hémocytes pouvait favoriser la dissémination de bactéries d'une moule à l'autre.

Le modèle du relargage/recapture d'hémocytes a été validé avec trois espèces de moules, ce qui permet d'avancer l'hypothèse que ce mécanisme pourrait en être un commun possiblement utilisé par l'ensemble des bivalves. Ce modèle où la bactérie s'infiltré dans l'hôte à l'aide d'une navette (hémocyte) nous amène à poser davantage de questions : Est-ce que d'autres types de stressseurs peuvent induire le relargage d'hémocytes? Dans une moulière naturelle, à quelle fréquence et dans quelles conditions le phénomène se produit-il? Pourquoi un tel partage de cellules immunes? Chez les mollusques, et en particulier les coques, il existe un transfert de facteurs immuns de la mère à sa progéniture (Yue et al 2013). Des exemples bien connus sont les PRR comme des lectines, des effecteurs tels des lysosymes, ou des antioxydants (Wang et al. 2015) qui confèrent une protection antibactérienne supplémentaire.

Le principe de « mémoire immune collective » peut également être illustré par un changement de la réponse immunitaire innée qui est décrite comme une immunotolérance (Novoa et al, 2019) lors d'une deuxième exposition au *Vibrio splendidus* chez *M. galloprovincialis*. Dans cet exemple, la première exposition induit la transcription de gènes d'inflammation, de migration et de réponse antibactérienne alors que la réexposition au même agent infectieux résulte en un transcrit inhibant la production de ROS et inhibant la réponse inflammatoire. De plus, la distribution de la population d'hémocytes est différente entre les deux inoculations. À l'échelle d'une moulière, on peut soulever l'hypothèse que le partage d'hémocytes « activés » servirait à déclencher plus rapidement la réponse immunitaire et à la moduler. En quelque sorte, il s'agirait d'un transfert horizontal de la « mémoire immune ». Ce concept nous amène à considérer la moulière comme un répertoire immun partagé et non comme un bagage immun propre à chaque individu. Un tel partage de populations hémocytaires représente également des désavantages tels les risques encourus de transmission horizontale de cancer dans toute la moulière. Les bivalves ne possèdent pas de système de reconnaissance du soi basé sur la discrimination entre le soi et le non-soi via les gènes du CMH, comme on le voit chez l'humain et la plupart des vertébrés. Cette absence apparente de mécanisme de reconnaissance du non-soi explique la transmission horizontale d'hémocytes néoplasiques entre les myes d'une même espèce (Metzger et al. 2015) ainsi qu'entre différentes espèces de bivalves (Metzger et al. 2016).

Le mécanisme utilisant l'hémocyte comme une navette, tel que nous avons démontré, permettrait non seulement la propagation de la leucémie, mais également celle de pathogènes bactériens ou

viraux. Certains virus, comme les virus de l'hépatite A et le norovirus humain peuvent résister à un pH acide et survivre dans les hémocytes de bivalves (Provost et al. 2011). Nos résultats pourraient expliquer que les bivalves représentent un réservoir de virus connus pour provoquer des zoonoses chez l'humain. Ils pourraient également expliquer que des stress thermiques, et possiblement d'autres formes de stress, pourraient favoriser la dissémination du rétrovirus Steamer observée chez les myes le long des Côtes Atlantiques (Arriagada 2014). Le même mécanisme pourrait aussi permettre à des parasites intracellulaires, tel que *Perkinsus marinus*, ou des bactéries, telles que *Vibrio parahaemolyticus*, sous sa forme encapsulée (Canesi et al. 2002), de « voyager » avec les hémocytes. Des études seront nécessaires pour mieux comprendre le rôle des hémocytes capturés par une moule naïve et comment il module la réponse immunitaire de la moule hôte. Afin d'y parvenir, une approche multi-omique en étudiant le transcriptome, le microbiome, le métabolome chez la moule receveur d'hémocytes « activés » permettrait de mieux comprendre les échanges immunitaires et leur implication sur les voies de signalisation.

8.3 Nouvelle logistique d'échantillonnage et approches multi-omiques

La première campagne à Kerguelen nous a appris que la logistique d'échantillonnage en région subantarctique peut être éprouvante et éreintante. Les efforts reliés au transport de bombonnes d'azote liquide et de moules (bullées dans l'eau de mer) dans des sacs à dos et la conservation des échantillons dans des congélateurs de -20°C et -80°C sur la base et sur le bateau se sont malheureusement souvent avérés vains en raison, que ce soit par le bris de la chaîne de froid sur la base, durant le transport en bateau et en avion, ou même à la douane. Il devenait donc impératif de développer une méthode d'échantillonnage répondant aux conditions difficiles du travail de terrain ne nécessitant pas de chaîne de froid et qui pourrait être adaptée à l'utilisation d'une nouvelle génération de biomarqueurs de stress. En s'inspirant de la technologie pour traiter les traces d'ADN sur les scènes de crime en médecine légale et en l'adaptant à une approche multi-omique, nous avons : 1) optimisé l'utilisation de cartes FTA pour le transport et la bancarisation de biopsies liquides constituées de culots cellulaires ou d'hémolymphe; 2) mis au point des méthodes d'extraction d'acides nucléiques pour l'analyse de transcriptomes et de microbiomes en comparant les performances de cette approche à l'utilisation d'échantillons congelés; et 3) utilisé cette méthode pour mettre en évidence, pour la première fois, la présence de ccfDNA chez la moule.

Les cartes de papier buvard de la technologie Flanders et associés (FTA) sont composées d'une base monovalente faible (Tris), d'un agent chélateur (EDTA), un détergent anionique (SDS) et de l'acide urique qui capture les radicaux libres afin de protéger à long terme la base guanine de l'ADN qui y est particulièrement sensible (Ames et al. 1981). Les cartes permettent de conserver les protéines ainsi que les acides nucléiques pour de longues périodes (testées jusqu'à 16 ans) avec une qualité suffisante pour amplifier des brins d'ADN de quelques centaines de nucléotides (Rahikainen et al 2016). Contrairement à la préservation par congélation des acides nucléiques, il est difficile toutefois d'amplifier de longs fragments de quelques kilobases comme le permet la congélation. La congélation ne dégrade pas l'ADN cependant elle affecte la quantité d'ADN extraite suite à un dégel par près de 25% (Ross et al. 1990). L'utilisation de cartes FTA doit donc être adaptée aux objectifs poursuivis, notamment ceux qui nécessitent une analyse de longs fragments. Elle est cependant parfaitement adaptée à l'analyse de microbiomes, de transcriptomes et de ccfDNA, dont la longueur de fragments se situe généralement dans les 150 pb. L'utilisation de cartes FTA requière aussi une optimisation des méthodes d'extraction de l'ADN afin d'obtenir une bonne quantité et qualité de l'ADN. À cet effet, nous avons utilisé différentes méthodes d'extraction à partir de cartes FTA. Nos études ont démontré que les méthodes basées sur le phénol/Chloroforme (comme le TRIzol) ou l'utilisation de la trousse *DNeasy Blood and Tissue* de Qiagen sont peu optimales pour l'extraction de l'ADN de moules à partir de culots ou de ccfDNA. La trousse *prepGEM Blood* de ZyGEM a donné quant à lui des résultats mitigés pour l'extraction de culots à partir de carte FTA. Bien que cette trousse soit très simple à utiliser, il s'est avéré très difficile à se la procurer. Nous avons opté au final pour la trousse *QIAamp DNA Investigator* de Qiagen qui donnait une bonne quantité d'ADN de qualité (Annexe 1).

L'extraction de très faibles quantités de ccfDNA à partir de carte FTA posait également une difficulté pour sa quantification. En utilisant un spectrophotomètre Nanodrop 2000C, nous obtenions des résultats erronés pour des quantités de moins de 25ng/ μ l même si la littérature suggère 5 ng/ μ l comme étant la limite inférieure de cet appareil (Yu et al. 2017). C'est pourquoi nous recommandons d'utiliser le dosage de l'ADN double brin avec la méthode Picogreen basée sur une courbe standard de différentes dilutions du Picogreen (intercalant de l'ADN). La concentration minimale mesurée est de 25 pg d'ADN total par échantillon (Anantanawat et al. 2019). Cette méthode nous a permis de constater que l'extraction de ccfDNA à partir d'hémolymphe fraîche avec la trousse *QIAamp DNA Investigator* est supérieure à celle obtenue

avec la trousse *Nucleosnap DNA Plasma* de Machrey-Nagel, une approche couramment utilisée chez l'humain (Annexe 1). De plus, cette dernière méthode est plus difficile à utiliser en raison de l'appareillage requis pour stabiliser les pressions d'aspiration et le fait que les membranes bloquent fréquemment. Les deux techniques sont néanmoins relativement coûteuses (environ \$7.00 par extraction). Le point négatif de ce type d'approche demeure néanmoins la difficulté d'obtenir de longs fragments d'ADN. Dans un tel cas, afin de répondre à ce problème dans un contexte de prélèvements en régions polaires, il serait à propos de considérer l'utilisation du MinION, un séquenceur miniaturisé développé par la compagnie britannique Oxford Nanopore et qui est adapté pour le « séquençage terrain » en région polaire. Cette technologie permet un séquençage de qualité avec une identification adéquate des séquences nucléotidiques dans un ordre de 94-95% (Tyler et al. 2018). La marge d'erreur de 5% permet certaines analyses telles l'identification d'espèces et le microbiome mais ne permet pas la recherche par exemple de mutations génomiques (Bowden et al. 2019). Également, la durée de vie de la cellule à écoulement (flow cell) est de trois mois. Celle-ci consiste en une membrane imprégnée de protéines possédant des nanopores au travers duquel passe la chaîne de nucléotides. Ces nucléotides changent l'amplitude du signal de courant qui est captée et analysée en temps réel. L'alignement des séquences peut donner une profondeur convenable de 18 équivalents génome dans l'exemple du séquençage du génome de l'anguille européenne (Jansen et al 2017).

En ce qui concerne la conservation et l'extraction de l'ARN sur carte FTA, à notre surprise, nous avons eu d'excellents résultats avec les techniques d'extraction au Trizol ou avec la trousse Rneasy de Qiagen. L'ARN est sensible à l'humidité qui peut accélérer le clivage du lien phosphodiester (Fabre et al. 2014) d'où l'avantage de l'environnement FTA qui est conservé avec un sachet dessicant qui en préserve l'intégrité. La fixation de l'ARN sur cartes FTA pourra donc faciliter les études transcriptomiques visant à mesurer, par exemple, l'expression de gènes de stress chez la moule en réponse à des stimuli environnementaux. En fait, nos études plus récentes ont démontré qu'il était possible de procéder à l'analyse de l'ARNm sans avoir recours à l'extraction. Il suffit tout simplement de synthétiser l'ADNc directement à partir de la carte FTA, simplifiant considérablement les analyses transcriptomiques. Nous pouvons également amplifier l'ADN directement à partir d'une carte FTA (Annexe 2).

La conservation de l'ARNm sur cartes FTA ouvre aussi de nombreuses portes pour des études futures sur les bivalves. La conservation d'échantillons sur FTA est devenue un modèle étendard en le combinant à la RT-PCR pour l'identification de virus à ARN tel le virus de la rage pour les

régions qui ont difficilement accès à un laboratoire (Léchenne et al. 2016). Elle pourrait donc faciliter l'identification de virus à ARN chez les bivalves. De plus, elle pourrait être utilisée pour identifier les petits fragments d'ARN d'intérêt tels les microARN (miRNA). Ces petites séquences non-codantes d'un peu plus d'une vingtaine de nucléotides possèdent un rôle de régulateur post-transcriptionnel de l'expression d'un gène (Mello et Conte 2004). La forme pré-miRNA d'origine nucléaire migre vers le cytoplasme où elle se lie à des protéines. Le complexe ainsi formé ira empêcher la traduction de la protéine. Chez les bivalves, les protéines qui y sont associées, telles Argonautes et Piwi, ont été identifiées chez *C. gigas* et *M. galloprovincialis* (Rosani et al. 2016). De plus, des centaines de miRNA ont été identifiés chez les hémocytes de *C. gigas* soumis à un stress thermique et une inoculation bactérienne. L'analyse comparative de ceux-ci a permis de mieux comprendre la modulation de la réponse immunitaire de l'huître soumise à ces mêmes stress (Zhou et al. 2014). Également, suite à la stimulation à l'épinéphrine et l'acétylcholine d'hémocytes de *C. gigas*, des miRNA ont été identifiés en lien avec des gènes impliqués dans la fonction immunitaire et la mort cellulaire. Au niveau physiologique, une baisse de la phagocytose et de l'apoptose tardive y était associée. Il s'agit d'une illustration de l'intérêt suscité par l'étude du répertoire des miRNAs dans une approche intégrée qui amène un début de compréhension de la modulation de la réponse immunitaire par des neurotransmetteurs (Chen et al. 2015).

Une autre application utile de la carte FTA concerne l'étude du microbiote du compartiment hémolympatique de la moule tel qu'obtenu lors de l'analyse des microbiotes de *A. atra* et *M. desolationis* prélevés au même moment à Port-aux-Français et dans la même moulière (Annexe 2). En conservant les culots hémocytaires sur carte FTA, il est possible d'en obtenir tout l'ADN du soi (ADN génomique de la moule) et du non-soi comme le bactériome à la manière d'une « capture instantanée » du paysage génomique. Étant donné que la moule possède un système circulatoire semi-ouvert, l'analyse du microbiote de l'hémolymphe revêt une double importance, soit de connaître le microbiote de base (signature) afin de pouvoir identifier les dysbioses i.e. un changement important du microbiote de base en lien avec des changements environnementaux ou des problèmes de santé de la moule. En second lieu, le microbiote peut servir à identifier des bactéries pathogènes chez la moule ou chez d'autres espèces environnantes terrestres ou marines (Ferchiou et al. manuscrit en préparation). L'identification du microbiote est possible en séquençant les gènes de l'ARNr 16S dans les régions variables V2-V4 (Klindworth et al. 2013) ce qui représente quelques centaines de nucléotides et qui est bien adapté pour les cartes FTA (Morales et al. 2019). Les cartes FTA sont toutefois peu compatibles aux analyses d'un génome entier bactérien en raison de la faible longueur des fragments d'ADN. L'utilisation de culots

hémocytaires sur cartes FTA est néanmoins intéressantes et ce même si la plupart des études de microbiotes, même chez les bivalves ont été, historiquement, réalisées à partir du système digestif des bivalves, comme c'est le cas chez l'humain. En comparant les microbiotes de *C. gigas* et *M. galloprovincialis* provenant d'une même zone d'élevage en Italie, des chercheurs ont toutefois déterminé que : 1) les microbiotes digestifs sont moins riches et moins diversifiés que les microbiotes de l'hémolymphe, 2) les microbiotes des hémolymphe des deux espèces de bivalves diffèrent et sont mieux adaptées pour la détection de pathogènes comme *vibrio*, et 3) le microbiote des bivalves diffère du microbiome marin environnant (Vezzulli et al 2018). Il est donc important d'établir une « signature » du microbiote de base du bivalve afin de suivre l'évolution de celui-ci lors de stress environnementaux. Un exemple de l'utilité de cette approche est l'étude microbiote du liquide palléal des huîtres afin de mesurer la marée noire causée par l'accident sur la plateforme Deep Water Horizon (Thomas IV et al, 2014). L'établissement d'une signature de base est d'autant plus important puisqu'il est logique de croire qu'il existe des variations saisonnières du microbiote reliées, par exemple, à des changements de température ou d'activités anthropiques (Lockmer et Wegner 2015). De plus, il existe des changements spatiaux directement en lien avec le micro-environnement immédiat des bivalves *C. gigas* (Lockmer et al. 2016). Enfin, plus d'études seront requises, idéalement sur une année, en y notant les périodes de pontes afin d'établir véritablement la signature de base selon l'espèce avant d'aller de l'avant avec des études plus sophistiquées d'évaluation des impacts anthropiques avec des observations à long terme. Ce n'est que lorsque ces conditions préalables seront atteintes que nous pourrons parler de dysbiose.

8.4 Biopsie liquide et ccfDNA : vers une approche multi-omique.

À partir d'une biopsie liquide, i.e. une prise d'hémolymphe chez la moule de façon non invasive et en utilisant l'hémolymphe acellulaire, nous avons : 1) extrait l'ADN circulant de *A. atra* et *M. edulis desolationis*, 2) identifié, annoté et caractérisé le « génome circulant » (« soi ») de *A. atra* et, 3) identifié et caractérisé la composition du « non-soi » circulant. Ces études sur le ccfDNA ont été inspirées des études chez l'humain où la mesure de l'ADN circulant représente une source d'information intéressante pour le clinicien (Aucamp et al. 2018). Par exemple, la concentration de ccfDNA plasmatique chez l'humain est significativement plus élevée chez des patients souffrant de maladies inflammatoires et souffrant de cancer (Ye et al. 2019). L'origine du ccfDNA peut également être utilisée pour détecter de façon précoce le rejet d'organes ou pour détecter

de façon non-invasive des anomalies génétiques chez le fœtus (Skrzypek et al. 2017). Dès le début, nous avons toutefois fait face à un défi de taille consistant à amplifier et comparer de petites quantités de ccfDNA de l'ordre du picogramme, poussant la qPCR à la limite de son spectre. Pour y parvenir, nous avons utilisé la technique de la PCR digitale en micro-compartiment (ddPCR). Cette technique utilisant une émulsion d'huile équivaut à obtenir une PCR unique pour chaque microgouttelette. Nous avons ainsi comparé le nombre de copies de gènes entre échantillons par une analyse « *copy number variant* ». De plus, afin de s'assurer de la qualité des résultats, nous avons utilisé un oligonucléotide synthétisé de concentration connue du gène *EF1 α* . Celui-ci nous a servi de témoin pour tester nos différents protocoles autant en qPCR qu'en ddPCR. Avec cette information en tête, nous avons mesuré la quantité totale d'ADN totale chez *M. edulis* soumise à un stress thermique durant 90 minutes. Nous n'avons pas constaté de différence dans les concentrations de ccfDNA entre le groupe témoin et le groupe soumis au stress de température (résultats non publiés). Ces résultats ne sont pas surprenants considérant que les moules évoluent dans des écosystèmes marins dont les températures peuvent osciller entre -8.2°C et +30.5°C (Davenport et al. 2005). Durant nos expériences de stress thermique, nous avons également quantifié l'ADN mitochondrial (ADNmt) puisque celui-ci sert de marqueur de valeur pronostique d'une infection, d'une inflammation ou d'un cancer tel celui de l'ovaire (Boyapati et al. 2017). Ainsi, l'ADNmt peut être considéré comme une alarmine en plus de moduler directement la réponse immunitaire. C'est pourquoi nous avons mesuré la quantité relative d'ADNmt par rapport à la quantité d'un gène de ménage (*EF1 α*). Toutefois, comme dans le cas du ccfDNA, aucune augmentation de l'ADNmt sous condition de stress thermique n'a été détectée, possiblement pour les mêmes raisons qu'avec le ccfDNA, ce qui suggère que les mécanismes de tolérance des bivalves sont très efficaces.

Les études sur le ccfDNA ne sont toutefois qu'au début et il reste à déterminer si d'autres stress pourront induire une augmentation de la concentration de ccfDNA dans l'hémolymphe de moules. Nous croyons, en fait, que le potentiel de l'analyse du ccfDNA chez la moule se situe surtout autour de l'origine des fragments d'ADN circulant. C'est pourquoi la dernière partie de ma thèse s'est consacrée à la caractérisation du ccfDNA du soi et du non-soi. Ces études du « non-soi » ont été inspirées notamment de l'étude de Kowarsky chez l'humain (Kowarsky 2017) démontrant que le plasma est une riche source d'information pour y détecter la présence de fragments d'ADN plasmatiques dérivés de pathogènes viraux et bactériens qui constituent jusqu'à 1% du ccfDNA. Considérant que l'écosystème marin contient jusqu'à 10^7 bactéries par ml d'eau de mer et plus de 10^8 (Suttle 2007) particules virales, il est logique de croire que l'analyse du non-soi du ccfDNA

de la moule représente une riche source d'information sur l'écosystème marin. Nos analyses de séquençage aléatoire à haut débit ont en effet permis d'identifier des bactéries méthanotrophiques et thiotrophiques vivant en symbiose dans les cellules épithéliales du manteau des moules. Elles se trouvent habituellement en profondeur près des événements hydrothermaux océaniques (Cavanaugh et al. 2006; Petersen et al. 2009). Ces mêmes bactéries pourraient utiliser le méthane produit par l'ensemble des archaées méthanogènes identifiées à partir du même séquençage. Ceci soulève la question à savoir pourquoi les retrouvons-nous dans les moules de Kerguelen? Aucun suintement froid (*cold seep*) a été décrit à Port aux Français mais une grande concentration de méthane contenu dans les dépôts quaternaires de la région de Port aux Français a été décrite (Vasiliev et al. 2015). Ces bactéries sont également connues pour vivre dans des zones de décomposition organique avec un apport faible en oxygène (Bienhold et al. 2013). Le nombre élevé d'éléphants de mer ainsi que la grande quantité de macrocystis pourraient favoriser les bactéries thiotrophiques. La réflexion mérite d'être approfondie en déterminant si les bactéries méthanotrophiques et thiotrophiques sont intrinsèques aux moules striées de Kerguelen ou s'il s'agit davantage d'une composante environnementale commune des écosystèmes subantarctiques littoraux. En mesurant la quantité d'oxygène, de méthane ou de crocétane, un marqueur de l'activité anaérobie de l'oxydation du méthane, dans l'eau de la Baie de Port-aux-Français, nous pourrions obtenir une meilleure compréhension sur l'importante quantité d'ADN bactérien obtenu dans le ccfDNA de *A. atra* et qui sont impliquées dans le cycle du méthane.

Les résultats de séquençage du ccfDNA du virome circulant ont par ailleurs généré des résultats intéressants. Sans surprise, le nombre de séquences assignées aux Myoviridés, en l'occurrence les bactériophages (Caudovirales), était élevé comparativement aux autres familles de virus. Les phages, qui possèdent un ADN double-brin dans 95% des cas, sont les particules virales les plus abondantes dans l'eau de mer. Cette domination des Myoviridés a d'ailleurs été rapportée dans plusieurs études de viromes marins réalisées à partir d'ADN environnemental (eDNA), notamment dans l'étude récente de Gregory et al (2019) dans le cadre du projet « Global Ocean Viromes 2.0 » qui rapporte les données de l'expédition *Tara Oceans Polar Circle*. Cette étude, effectuée à partir d'échantillons recueillis dans la zone mésopélagique dans les différents océans de la planète, a recensé plus de 200 000 espèces de virus. Comme eux, nous avons également retrouvé plusieurs fragments d'ADN dérivés des membres de la famille des Mimiviridés, une famille de virus récemment identifiée et connue pour infecter les protistes (Claverie et al. 2018). Comme dans l'étude de Gregory et al (2019), on retrouve plusieurs types de virus géants à ADN

nucléocytoplasmique (*NucleoCytoplasmic Large DNA Viruses*, NCLDV), comme les Pandoravirus, le Pithovirus, le Marseillevirus, de même que des virus de plantes (Phycodnaviridés). À la différence des résultats de Gregory, toutefois, nous retrouvons une plus grande représentation de Baculovirus, une famille de virus dont les membres sont bien connus pour infecter les insectes. Cette différence s'explique sans doute par la richesse des populations d'insectes que l'on retrouve dans les écosystèmes marins alors que l'étude de Gregory s'est concentrée sur les écosystèmes plus profonds (150 à 1000 m). Cette hypothèse est supportée par une proportion relativement importante de Nudivirus, connus eux aussi pour infecter les insectes de même que les crustacés (Wang et al. 2007). Il reste que ces résultats ne représentent que la pointe de l'iceberg en ce qui a trait à la diversité de la virosphère en milieu marin. L'étude récente de Gregory démontre notamment que parmi les 3.5 Tb de séquences virales analysées lors de leurs études, plus de 90% de celles-ci ne peuvent être taxonomiquement classées.

Étant donné que la moule est un organisme filtreur, nous avons également émis comme hypothèse que son hémolymphe pourrait contenir des fragments d'ADN d'autres organismes eucaryotes présents dans l'environnement marin. Cette hypothèse tirait son origine de la recherche de la biodiversité d'un écosystème à partir de l'analyse de eDNA et du fait de la grande capacité de filtration de l'eau de mer par les bivalves et de leur système semi-ouvert. Nos assignations préliminaires suggèrent la présence de fragments d'ADN de métazoaires dans 18% des contigs annotés à partir d'un séquençage à haut-débit du ccfDNA de *A. atra* (Annexe 3). Nous avons tenté de confirmer cette présence en utilisant une paire d'amorces dégénérées qui amplifie une partie du gène codant pour la Cytochrome oxydase sous-unité 1 (CO1) jumelée à la technique d'amplification par codes à barres de l'ADN (metabarcoding). En utilisant des critères stringents de l'annotation des reads ainsi obtenus (> 80% d'homologie et une valeur $e < -20$) nous avons obtenu respectivement 2.7%, 6.4% et 6.6% des reads annotés à des métazoaires autres que les bivalves (Ferchiou, Caza et al., manuscrit en préparation). Ces résultats rejoignent les analyses de ccfDNA humains où le pourcentage d'ADN non humain se situait autour de 1% (Kowarsky et al. 2017). L'étude de 200 primates en Afrique a démontré un taux semblable de 1.2% dont 0.29% pouvant être assignés à du non-soi après une deuxième ronde de Blast pour éliminer les séquences du soi (Kowarsky et al. 2018). Cette étude permettait de mettre en évidence le caractère géographique de la distribution du microbiome des primates sans égard à leur espèce contrairement à celle des virus non-phages qui suggérait une association selon l'espèce. Il sera intéressant de pousser les recherches chez la moule dans cette direction en

postulant que l'identification des fragments d'ADN du non-soi de la moule pourrait être le reflet de la biodiversité et la santé du milieu côtier marin.

Globalement, il est permis de croire que nos analyses du ccfDNA chez la moule pourront faciliter d'autres analyses de types « omiques », notamment au niveau du méthylome. La méthylation d'ADN est d'ailleurs bien connue pour être très sensible aux stress environnementaux (Szyf, 2009). L'utilisation du MINion, qui permet de caractériser rapidement le méthylome d'un génome (Zink et al. 2018; Simpson et al. 2017) sans avoir recours à des traitements de l'ADN (comme au bisulfite, par exemple), pourrait s'avérer un outil efficace dans ce contexte. Nous avons d'ailleurs l'intention au cours de nos prochaines campagnes à Kerguelen de mettre à profit cette technologie afin de poursuivre nos études comparatives sur l'épigénome entre la moule bleue et la moule striée en regard des différents sites et sources de stress.

CONCLUSION GENERALE

Nos études comparatives des moules de Kerguelen ont apporté de nouvelles connaissances sur la moule striée. Nous avons maintenant une meilleure compréhension de sa réponse au stress thermique et des mécanismes physiologiques fondamentaux qui la distingue de la moule bleue. Nous avons mis en évidence le partage d'hémocytes entre deux moules de la même espèce. Ce modèle permet d'expliquer la propagation de bactéries ou parasites intracellulaires ou de leucémie chez la moule. De plus, nous avons mis au point une méthode d'échantillonnage simple adaptée aux conditions extrêmes des régions polaires. Cette méthode permet de faciliter la mise en place d'un observatoire à long terme. Cette méthode est compatible avec une approche multi-omique. En s'inspirant des avancées technologiques de séquençage à haut débit utilisées en médecine, nous avons développé une nouvelle génération de biomarqueurs tel l'analyse du microbiote, du transcriptome, du génome circulant du soi et du non-soi.

Nous croyons que le développement de telles approches multi-omiques permettra de détecter de façon précoce des changements moléculaires induits par des stress environnementaux, bien avant l'apparition de problèmes. Elles permettront également de suivre avec précision les processus de remédiation, comme elles sont utilisées chez le patient pour suivre l'efficacité d'un traitement. La « démocratisation » des approches basées sur le séquençage à haut débit sera essentielle afin d'assurer le succès de telles approches.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, J.P., Baringer, M., Bindoff, N.L., Boyer, T., Cheng, L.J., Church, J.A., Conroy, J.L., Domingues, C.M., Fasullo, J.T., Gilson, J. and Goni, G., 2013. A review of global ocean temperature observations: Implications for ocean heat content estimates and climate change. *Reviews of Geophysics*, 51(3), pp.450-483.
- Ammerlaan, W., & Betsou, F. (2019). Biospecimen Science of Blood for cfDNA Genetic Analyses. *Current Pathobiology Reports*, 7(2), 9-15.
- Anantanawat, K., Pitsch, N., Fromont, C., & Janitz, C. (2019). High-throughput Quant-iT PicoGreen assay using an automated liquid handling system. *BioTechniques*, 66(6), 290-294.
- Aronson, R. B. W. F., Precht, W., Toscano, M., & Koltjes, K. H. (2002). The 1998 bleaching event and its aftermath on a coral reef in Belize. *Marine Biology*, 141(3), 435-447.
- Arriagada, G., Metzger, M. J., Muttray, A. F., Sherry, J., Reinisch, C., Street, C., ... & Goff, S. P. (2014). Activation of transcription and retrotransposition of a novel retroelement, Steamer, in neoplastic hemocytes of the mollusk *Mya arenaria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(39), 14175-14180.
- Ashton-Alcox, K. A., & Ford, S. E. (1998). Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue and Cell*, 30(2), 195-204.
- Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D., & Duchemin, M. (2006). A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3), 393-405.
- Babarro, J. M., & Comeau, L. A. (2014). Byssus attachment strength of two mytilids in mono-specific and mixed-species mussel beds. *Biofouling*, 30(8), 975-985.
- Balseiro, P., Falcó, A., Romero, A., Dios, S., Martínez-López, A., Figueras, A., ... & Novoa, B. (2011). *Mytilus galloprovincialis* myticin C: a chemotactic molecule with antiviral activity and immunoregulatory properties. *PLoS One*, 6(8).
- Bashiardes, S., Zilberman-Schapira, G., & Elinav, E. (2016). Use of metatranscriptomics in microbiome research. *Bioinformatics and biology insights*, 10, BBI-S34610.
- Beliaeff, B., O'Connor, T. P., Daskalakis, D. K., & Smith, P. J. (1997). US mussel watch data from 1986 to 1994: temporal trend detection at large spatial scales. *Environmental science & technology*, 31(5), 1411-1415.
- Bernhoft, R. A. (2013). Cadmium toxicity and treatment. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Bindoff, N. L., & Hobbs, W. R. (2013). Oceanography: Deep ocean freshening. *Nature Climate Change*, 3(10), 864-865.
- Bock, C., Farlik, M., & Sheffield, N. C. (2016). Multi-omics of single cells: strategies and applications. *Trends in biotechnology*, 34(8), 605-608.

- Bowden, R., Davies, R. W., Heger, A., Pagnamenta, A. T., de Cesare, M., Oikkonen, L. E., ... & Popitsch, N. (2019). Sequencing of human genomes with nanopore technology. *Nature communications*, 10(1), 1-9.
- Bowie, A. R., Van Der Merwe, P., Qu  rou  , F., Trull, T. W., Fourquez, M., Planchon, F., ... & Sall  e, J. B. (2015). Iron budgets for three distinct biogeochemical sites around the Kerguelen Archipelago (Southern Ocean) during the natural fertilisation study, KEOPS-2.
- Boyapati, R. K., Tamborska, A., Dorward, D. A., & Ho, G. T. (2017). Advances in the understanding of mitochondrial DNA as a pathogenic factor in inflammatory diseases. *F1000Research*, 6.
- Broeg, K., Westernhagen, H. V., Zander, S., K  rting, W., & K  hler, A. (2005). The "bioeffect assessment index"(BAI): a concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine pollution bulletin*, 50(5), 495-503.
- Brum, J. R., & Sullivan, M. B. (2015). Rising to the challenge: accelerated pace of discovery transforms marine virology. *Nature Reviews Microbiology*, 13(3), 147-159.
- Bryden, H. L., Longworth, H. R., & Cunningham, S. A. (2005). Slowing of the Atlantic meridional overturning circulation at 25 N. *Nature*, 438(7068), 655-657.
- Burge, C. A., Mark Eakin, C., Friedman, C. S., Froelich, B., Hershberger, P. K., Hofmann, E. E., ... & Ford, S. E. (2014). Climate change influences on marine infectious diseases: implications for management and society. *Annual review of marine science*, 6, 249-277.
- Caldeira, K., & Wickett, M. E. (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425(6956), 365-365.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., & Pruzzo, C. (2002). Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy research and technique*, 57(6), 469-476.
- Caza, F., Cledon, M., & St-Pierre, Y. (2016). Biomonitoring climate change and pollution in marine ecosystems: a review on *Aulacomya ater*. *Journal of Marine Biology*, 2016.
- Chainark, P., Satoh, S., Hirono, I., Aoki, T., & Endo, M. (2008). Availability of genetically modified feed ingredient: investigations of ingested foreign DNA in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science*, 74(2), 380-390.
- Chen, H., Wang, L., Zhou, Z., Hou, Z., Liu, Z., Wang, W., ... & Song, L. (2015). The comprehensive immunomodulation of NeurimmiRs in haemocytes of oyster *Crassostrea gigas* after acetylcholine and norepinephrine stimulation. *BMC genomics*, 16(1), 942.
- Chornenki, N. L. J., Coke, R., Kwong, A. C., Dwivedi, D. J., Xu, M. K., McDonald, E., ... & Liaw, P. C. (2019). Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis. *Intensive care medicine experimental*, 7(1), 1-10.
- Ciacci, C., Citterio, B., Betti, M., Canonico, B., Roch, P., & Canesi, L. (2009). Functional differential immune responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 153(4), 365-371.

- Claverie, J. M., & Abergel, C. (2018). Mimiviridae: an expanding family of highly diverse large dsDNA viruses infecting a wide phylogenetic range of aquatic eukaryotes. *Viruses*, *10*(9), 506.
- Compton, T. J., Rijkenberg, M. J., Drent, J., & Piersma, T. (2007). Thermal tolerance ranges and climate variability: a comparison between bivalves from differing climates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *352*(1), 200-211.
- Cook, J. (1777). *A Voyage Towards the South Pole, and Round the World: Performed in His Majesty's Ships the Resolution and Adventure, in the Years 1772, 1773, 1774, and 1775* (Vol. 1). W. Strahan & T. Cadell.
- Crowley, Emily, Federica Di Nicolantonio, Fotios Loupakis, and Alberto Bardelli. "Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood." *Nature reviews Clinical oncology* *10*, no. 8 (2013): 472.
- Davenport, J., & Davenport, J. L. (2005). Effects of shore height, wave exposure and geographical distance on thermal niche width of intertidal fauna. *Marine Ecology Progress Series*, *292*, 41-50.
- De Boissel, P. G. J., Fournier, M., Rodriguez-Lecompte, J. C., McKenna, P., Kibenge, F., & Siah, A. (2017). Functional and molecular responses of the blue mussel *Mytilus edulis*' hemocytes exposed to cadmium-An in vitro model and transcriptomic approach. *Fish & shellfish immunology*, *67*, 575-585.
- Decker, M. B., Brown, C. W., Hood, R. R., Purcell, J. E., Gross, T. F., Matanoski, J. C., ... & Setzler-Hamilton, E. M. (2007). Predicting the distribution of the scyphomedusa *Chrysaora quinquecirrha* in Chesapeake Bay. *Marine Ecology Progress Series*, *329*, 99-113.
- Ebrahim, A., Brunk, E., Tan, J., O'brien, E. J., Kim, D., Szubin, R., ... & Feist, A. M. (2016). Multi-omic data integration enables discovery of hidden biological regularities. *Nature communications*, *7*(1), 1-9.
- Fabre, A. L., Colotte, M., Luis, A., Tuffet, S., & Bonnet, J. (2014). An efficient method for long-term room temperature storage of RNA. *European Journal of Human Genetics*, *22*(3), 379-385.
- Farrar, J. T., & Plueddemann, A. J. (2019). On the factors driving upper-ocean salinity variability at the western edge of the Eastern Pacific Fresh Pool. *Oceanography (Washington, DC)*, *32*(2), 30.
- Farrington, J. W., Tripp, B. W., Tanabe, S., Subramanian, A., Sericano, J. L., Wade, T. L., & Knap, A. H. (2016). Edward D. Goldberg's proposal of "the mussel watch": reflections after 40 years. *Marine pollution bulletin*, *110*(1), 501-510.
- Feely, R. A., Alin, S. R., Newton, J., Sabine, C. L., Warner, M., Devol, A., ... & Maloy, C. (2010). The combined effects of ocean acidification, mixing, and respiration on pH and carbonate saturation in an urbanized estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *88*(4), 442-449.
- Feyrer, Frederick, James E. Cloern, Larry R. Brown, Maxfield A. Fish, Kathryn A. Hieb, and Randall D. Baxter. "Estuarine fish communities respond to climate variability over both river and ocean basins." *Global Change Biology* *21*, no. 10 (2015): 3608-3619.

- Fleischhacker, M., and Schmidt, B. (2007). Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim. Biophys. Acta* 1775, 181–232.
- Frenot, Y., Gloaguen, J. C., Picot, G., Bougère, J., & Benjamin, D. (1993). Azorella selago Hook. used to estimate glacier fluctuations and climatic history in the Kerguelen Islands over the last two centuries. *Oecologia*, 95(1), 140-144.
- Gaitán-Espitia, J. D., Quintero-Galvis, J. F., Mesas, A., & D'Elía, G. (2016). Mitogenomics of southern hemisphere blue mussels (*Bivalvia*: Pteriomorpha): Insights into the evolutionary characteristics of the *Mytilus edulis* complex. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.
- Gallinato, C. S. (2009). *Modelling of productivity, water quality effects and profit optimization of Pacific oyster (Crassostrea gigas) farms: application of the FARM model and GIS in the Valdivia estuary of Chile* (Doctoral dissertation).
- Garcia-Eidell, C., Comiso, J. C., Dinnat, E., & Brucker, L. (2019). Sea Surface Salinity Distribution in the Southern Ocean as Observed from Space. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 124(5), 3186-3205.
- Gérard, K., Bierne, N., Borsa, P., Chenuil, A., & Féral, J. P. (2008). Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. mussels from Northern and Southern Hemispheres and strong genetic differentiation among southern populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(1), 84-91.
- Gerdol, M., Gomez-Chiarri, M., Castillo, M. G., Figueras, A., Fiorito, G., Moreira, R., ... & Venier, P. (2018). Immunity in molluscs: recognition and effector mechanisms, with a focus on bivalvia. In *Advances in comparative immunology* (pp. 225-341). Springer, Cham.
- Ghaemi, M. S., DiGiulio, D. B., Contrepolis, K., Callahan, B., Ngo, T. T., Lee-McMullen, B., ... & Wong, R. J. (2019). Multiomics modeling of the immunome, transcriptome, microbiome, proteome and metabolome adaptations during human pregnancy. *Bioinformatics*, 35(1), 95-103.
- Ghosh, S., Tiwari, R., Hemamalini, R., & Khare, S. K. (2017). Multi-omic approaches for mapping interactions among marine microbiomes. In *Understanding Host-Microbiome Interactions-An Omics Approach* (pp. 353-368). Springer, Singapore.
- Goldberg, E. D., & Bertine, K. K. (2000). Beyond the mussel watch—new directions for monitoring marine pollution. *Science of the Total Environment*, 247(2-3), 165-174.
- Goldsmid, J., Archambault, P., Chust, G., Villarino, E., Liu, G., Lukovich, J. V., ... & Howland, K. L. (2018). Projecting present and future habitat suitability of ship-mediated aquatic invasive species in the Canadian Arctic. *Biological Invasions*, 20(2), 501-517.
- Goldsmid, J., McKindsey, C. W., Schlegel, R. W., Stewart, D. B., Archambault, P., & Howland, K. L. (2020). What and where? Predicting invasion hotspots in the Arctic marine realm. *Global change biology*, 26(9), 4752-4771.
- Gregory, A. C., Zayed, A. A., Conceição-Neto, N., Temperton, B., Bolduc, B., Alberti, A., ... & Dimier, C. (2019). Marine DNA viral macro-and microdiversity from pole to pole. *Cell*, 177(5), 1109-1123.

- Guerra-Rivas, G., Gómez-Gutiérrez, C. M., & Márquez-Rocha, F. J. (2002). Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on the pallial fluid buffering capacity of the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 132(2), 171-179.
- Hanekom, N. (2008). Invasion of an indigenous *Perna perna* mussel bed on the south coast of South Africa by an alien mussel *Mytilus galloprovincialis* and its effect on the associated fauna. *Biological Invasions*, 10(2), 233-244.
- Hasin, Y., Seldin, M., & Lusi, A. (2017). Multi-omics approaches to disease. *Genome biology*, 18(1), 83.
- He, Q., & Silliman, B. R. (2019). Climate change, human impacts, and coastal ecosystems in the Anthropocene. *Current Biology*, 29(19), R1021-R1035.
- Helmuth, B.S.T. (2002). How do we measure the environment? Linking intertidal thermal physiology and ecology through biophysics. *Integr. Comp. Biol.* 42, 837–845.
- Jandhyala, S. M., Madhulika, A., Deepika, G., Rao, G. V., Reddy, D. N., Subramanyam, C., ... & Talukdar, R. (2017). Altered intestinal microbiota in patients with chronic pancreatitis: implications in diabetes and metabolic abnormalities. *Scientific reports*, 7, 43640.
- Jansen, H. J., Liem, M., Jong-Raadsen, S. A., Dufour, S., Weltzien, F. A., Swinkels, W., ... & Van den Thillart, G. E. (2017). Rapid de novo assembly of the European eel genome from nanopore sequencing reads. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- Jeandel, C., Ruiz-Pino, D., Gjata, E., Poisson, A., Brunet, C., Charriaud, E., ... & Miquel, J. C. (1998). KERFIX, a time-series station in the Southern Ocean: a presentation. *Journal of Marine Systems*, 17(1-4), 555-569.
- Kimmel DG, Boynton WR, Roman MR (2012) Long-term decline in the calanoid copepod *Acartia tonsa* in central Chesapeake Bay, USA: an indirect effect of eutrophication? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 101, 76–85.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1-e1.
- Kowarsky, M., Camunas-Soler, J., Kertesz, M., De Vlaminc, I., Koh, W., Pan, W., ... & Kharbanda, S. (2017). Numerous uncharacterized and highly divergent microbes which colonize humans are revealed by circulating cell-free DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(36), 9623-9628.
- Kowarsky, M., De Vlaminc, I., Okamoto, J., Neff, N. F., LeBreton, M., Nwobegabay, J., ... & Saylor, K. (2018). Cell-free DNA Reveals Potential Zoonotic Reservoirs in Non-Human Primates. *bioRxiv*, 481093.
- Kuska, B. (1998). Beer, Bethesda, and biology: how “genomics” came into being.

- Lathlean, J. A., Seuront, L., McQuaid, C. D., Ng, T. P., Zardi, G. I., & Nicastro, K. R. (2016). Cheating the locals: invasive mussels steal and benefit from the cooling effect of indigenous mussels. *PLoS One*, *11*(3).
- Léchenne, M., Naïssengar, K., Lepelletier, A., Alfaroukh, I. O., Bourhy, H., Zinsstag, J., & Dacheux, L. (2016). Validation of a rapid rabies diagnostic tool for field surveillance in developing countries. *PLoS neglected tropical diseases*, *10*(10).
- Leek, J. T., Scharpf, R. B., Bravo, H. C., Simcha, D., Langmead, B., Johnson, W. E., ... & Irizarry, R. A. (2010). Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data. *Nature Reviews Genetics*, *11*(10), 733-739.
- Le Foll, F., Rioult, D., Boussa, S., Pasquier, J., Dagher, Z., & Leboulenger, F. (2010). Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish & shellfish immunology*, *28*(2), 372-386.
- Lokmer, A., and Wegner, K. M. (2015). Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME J.* *9*, 670–682. doi: 10.1038/ismej.2014.160
- Lokmer, A., Goedknecht, M. A., Thielges, D. W., Fiorentino, D., Kuenzel, S., Baines, J. F., & Wegner, K. M. (2016). Spatial and temporal dynamics of Pacific oyster hemolymph microbiota across multiple scales. *Frontiers in microbiology*, *7*, 1367.
- Mackenzie Jr, C. L. (2007). Causes underlying the historical decline in eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin, 1791) landings. *Journal of Shellfish Research*, *26*(4), 927-938.
- Mandel, P., & Metais, P. (1948). Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, *142*(3-4), 241-243.
- Mathys, H., Davila-Velderrain, J., Peng, Z., Gao, F., Mohammadi, S., Young, J. Z., ... & Martorell, A. J. (2019). Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. *Nature*, *570*(7761), 332-337.
- Matozzo, V., & Marin, M. G. (2011). Bivalve immune responses and climate changes: is there a relationship? *Invertebrate survival journal*, *8*(1), 70-77.
- Matozzo, V. (2016). Aspects of eco-immunology in molluscs. *Invertebrate Survival Journal*, *13*(1), 116-121.
- Medzhitov, R., & Janeway Jr, C. A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology*, *9*(1), 4-9.
- Mello, C. C., & Conte, D. (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature*, *431*, 338-342.
- Metzger, M. J., Reinisch, C., Sherry, J., & Goff, S. P. (2015). Horizontal transmission of clonal cancer cells causes leukemia in soft-shell clams. *Cell*, *161*(2), 255-263.
- Metzger, M. J., Villalba, A., Carballal, M. J., Iglesias, D., Sherry, J., Reinisch, C., ... & Goff, S. P. (2016). Widespread transmission of independent cancer lineages within multiple bivalve species. *Nature*, *534*(7609), 705-709.

- Milani, L., Ghiselli, F., Guerra, D., Breton, S., & Passamonti, M. (2013). A comparative analysis of mitochondrial ORFans: new clues on their origin and role in species with doubly uniparental inheritance of mitochondria. *Genome biology and evolution*, 5(7), 1408-1434.
- Moffitt, S. E., Hill, T. M., Roopnarine, P. D., & Kennett, J. P. (2015). Response of seafloor ecosystems to abrupt global climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(15), 4684-4689.
- Morales, E., Chen, J., & Greathouse, K. L. (2019). Compositional analysis of the human microbiome in cancer research. In *Cancer Metabolism* (pp. 299-335). Humana Press, New York, NY.
- Morat, F., Betoulle, S., Robert, M., Thailly, A. F., Biagianti-Risbourg, S., & Lecomte-Finiger, R. (2008). What can otolith examination tell us about the level of perturbations of Salmonid fish from the Kerguelen Islands? *Ecology of Freshwater Fish*, 17(4), 617-627.
- Mucci, A., Starr, M., Gilbert, D., & Sundby, B. (2011). Acidification of lower St. Lawrence Estuary bottom waters. *Atmosphere-Ocean*, 49(3), 206-218.
- Muller-Karger, F. E., Hestir, E., Ade, C., Turpie, K., Roberts, D. A., Siegel, D., ... & Morgan, F. (2018). Satellite sensor requirements for monitoring essential biodiversity variables of coastal ecosystems. *Ecological applications*, 28(3), 749-760.
- Neumann, M. H., Bender, S., Krahn, T., & Schlange, T. (2018). ctDNA and CTCs in liquid biopsy—current status and where we need to progress. *Computational and structural biotechnology journal*, 16, 190-195.
- NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration). 2016. NOAA Merged Land Ocean Global Surface Temperature Analysis (NOAAGlobalTemp): Global gridded 5° x 5° data. National Centers for Environmental Information. Accessed June 2016.
www.ncdc.noaa.gov/data-access/marineocean-data/noaa-global-surface-temperature-noaaglobaltemp.
- Noel D, Pipe R, Elston R, Bachere E, Mialhe E (1994) Antigenic characterization of hemocyte subpopulations in the mussel *Mytilus edulis* by means of monoclonal antibodies. *Mar Biol* 119:549-556
- Nolting, R. F., De Baar, H. J. W., Van Bennekom, A. J., & Masson, A. (1991). Cadmium, copper and iron in the Scotia sea, Weddell Sea and Weddell/Scotia confluence (Antarctica). *Marine Chemistry*, 35(1-4), 219-243.
- Novoa, B., Figueras, A., Rey-Campos, M., Moreira, R., Gerdol, M., & Pallavicini, A. (2019). Immune tolerance in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes after repeated contact with *Vibrio splendidus*. *Frontiers in immunology*, 10, 1894.
- Orr, J. C., Fabry, V. J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S. C., Feely, R. A., ... & Yool, A. (2005). Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437(7059), 681-686.

- Paez-Espino, D., Eloie-Fadrosh, E. A., Pavlopoulos, G. A., Thomas, A. D., Huntemann, M., Mikhailova, N., ... & Kyrpides, N. C. (2016). Uncovering Earth's virome. *Nature*, 536(7617), 425-430.
- Planchon, F. A., Boutron, C. F., Barbante, C., Cozzi, G., Gaspari, V., Wolff, E. W., ... & Cescon, P. (2002). Changes in heavy metals in Antarctic snow from Coats Land since the mid-19th to the late-20th century. *Earth and Planetary Science Letters*, 200(1-2), 207-222.
- Pipe, R. K., Farley, S. R., & Coles, J. A. (1997). The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell and tissue research*, 289(3), 537-545.
- Poloczanska, E. S., Brown, C. J., Sydeman, W. J., Kiessling, W., Schoeman, D. S., Moore, P. J., ... & Duarte, C. M. (2013). Global imprint of climate change on marine life. *Nature Climate Change*, 3(10), 919-925.
- Provost, K., Dancho, B. A., Ozbay, G., Anderson, R. S., Richards, G. P., & Kingsley, D. H. (2011). Hemocytes are sites of enteric virus persistence within oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(23), 8360-8369.
- Przeslawski, R., Byrne, M., & Mellin, C. (2015). A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Global change biology*, 21(6), 2122-2140.
- Rabassa, J., Gordillo, S., Ocampo, C., & Hurtado, P. R. (2008). The southernmost evidence for an interglacial transgression (Sangamon?) in South America. First record of upraised Pleistocene marine deposits in Isla Navarino (Beagle Channel, Southern Chile). *Geologica Acta*, 6(3), 251-258.
- Rahikainen, A. L., Palo, J. U., de Leeuw, W., Budowle, B., & Sajantila, A. (2016). DNA quality and quantity from up to 16 years old post-mortem blood stored on FTA cards. *Forensic science international*, 261, 148-153.
- Rainbow, P. S., & Luoma, S. N. (2011). Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates—modelling zinc in crustaceans. *Aquatic toxicology*, 105(3-4), 455-465.
- Reise, K., Buschbaum, C., Büttger, H., & Wegner, K. M. (2017). Invading oysters and native mussels: from hostile takeover to compatible bedfellows. *Ecosphere*, 8(9), e01949.
- Riisgård, H. U. (2001). On measurement of filtration rates in bivalves—the stony road to reliable data: review and interpretation. *Marine Ecology Progress Series*, 211, 275-291.
- Riisgård, H. U., Egede, P. P., & Barreiro Saavedra, I. (2011). Feeding behaviour of the mussel, *Mytilus edulis*: new observations, with a minireview of current knowledge. *Journal of Marine Biology*, 2011.
- Rilov, G., Benayahu, Y., & Gasith, A. (2004). Prolonged lag in population outbreak of an invasive mussel: a shifting-habitat model. *Biological Invasions*, 6(3), 347-364.
- Robson, J., Ortega, P., & Sutton, R. (2016). A reversal of climatic trends in the North Atlantic since 2005. *Nature Geoscience*, 9(7), 513-517.

- Reid, H. I., Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C., & Birkbeck, T. H. (2003). Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of aquatic organisms*, 56(3), 249-258.
- Rohwer, F., & Thurber, R. V. (2009). Viruses manipulate the marine environment. *Nature*, 459(7244), 207-212.
- Rosani, U., Pallavicini, A., & Venier, P. (2016). The miRNA biogenesis in marine bivalves. *PeerJ*, 4, e1763.
- Ross, K. S., Haites, N. E., & Kelly, K. F. (1990). Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: effects on DNA yield and integrity. *Journal of medical genetics*, 27(9), 569-570.
- 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). *Aquatic toxicology*, 58(3-4), 189-200.
- Schubbert, R., Lettmann, C., & Doerfler, W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecular and General Genetics MGG*, 242(5), 495-504.
- Schwarzenbach, H., Hoon, D. S., & Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), 426-437.
- Sheir, S. K., & Handy, R. D. (2010). Tissue injury and cellular immune responses to cadmium chloride exposure in the common mussel *Mytilus edulis*: modulation by lipopolysaccharide. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 59(4), 602-613.
- Shrager, J., & Tenenbaum, J. M. (2014). Rapid learning for precision oncology. *Nature reviews Clinical oncology*, 11(2), 109.
- Shumway, S. E. (1977). Effect of salinity fluctuation on the osmotic pressure and Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ion concentrations in the hemolymph of bivalve molluscs. *Marine Biology*, 41(2), 153-177.
- Simpson, J. T., Workman, R. E., Zuzarte, P. C., David, M., Dursi, L. J., & Timp, W. (2017). Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. *Nature methods*, 14(4), 407-410.
- Somavilla, R., González-Pola, C., Lavín, A., & Rodríguez, C. (2013). Temperature and salinity variability in the south-eastern corner of the Bay of Biscay (NE Atlantic). *Journal of Marine Systems*, 109, S105-S120.
- Snyder, M. W., Kircher, M., Hill, A. J., Daza, R. M., & Shendure, J. (2016). Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell*, 164(1-2), 57-68.
- Spisák, S., Solymosi, N., Itzész, P., Bodor, A., Kondor, D., Vattay, G., ... & Szállási, Z. (2013). Complete genes may pass from food to human blood. *PLoS One*, 8(7), e69805.

- Srokosz, M., Baringer, M., Bryden, H., Cunningham, S., Delworth, T., Lozier, S., ... & Sutton, R. (2012). Past, present, and future changes in the Atlantic meridional overturning circulation. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 93(11), 1663-1676.
- Steinhoff, T., Gkritzalis, T., Lauvset, S. K., Jones, S., Schuster, U., Olsen, A., ... & Watson, A. (2019). Constraining the oceanic uptake and fluxes of greenhouse gases by building an ocean network of certified stations: the ocean component of the Integrated Carbon Observation System, ICOS-Oceans. *Frontiers in Marine Science*, 6, 544.
- Suttle, C. A. (2005). Viruses in the sea. *Nature*, 437(7057), 356-361.
- Suttle, C. A. (2007). Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 801-812.
- Svendsen, C., Spurgeon, D. J., Hankard, P. K., & Weeks, J. M. (2004). A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57(1), 20-29.
- Szyf M. (2009). The early life environment and the epigenome. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790(9), 878-85.
- Tan, E. M., & Kunkel, H. G. (1966). Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*, 96(3), 464-471.
- Tanaka, S., Sugimoto, S., Kurosaki, T., Miyoshi, K., Otani, S., Suzawa, K., ... & Toyooka, S. (2018). Donor-derived cell-free DNA is associated with acute rejection and decreased oxygenation in primary graft dysfunction after living donor-lobar lung transplantation. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.
- Tapia, J., Vargas-Chacoff, L., Bertrán, C., Carrasco, G., Torres, F., Pinto, R., ... & Letelier, L. (2010). Study of the content of cadmium, chromium and lead in bivalve molluscs of the Pacific Ocean (Maule Region, Chile). *Food Chemistry*, 121(3), 666-671.
- Thomas IV, J. C., Wafula, D., Chauhan, A., Green, S. J., Gragg, R., & Jagoe, C. (2014). A survey of deepwater horizon (DWH) oil-degrading bacteria from the Eastern oyster biome and its surrounding environment. *Frontiers in microbiology*, 5, 149.
- Tyler, A. D., Mataseje, L., Urfano, C. J., Schmidt, L., Antonation, K. S., Mulvey, M. R., & Corbett, C. R. (2018). Evaluation of Oxford Nanopore's MinION sequencing device for microbial whole genome sequencing applications. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.
- Underhill, D. M., & Goodridge, H. S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(7), 492-502.
- van der Gaag, M., van der Velde, G., Wijnhoven, S., & Leuven, R. S. (2016). Salinity as a barrier for ship hull-related dispersal and invasiveness of dreissenid and mytilid bivalves. *Marine biology*, 163(7), 147.
- Veldore, V. H., Choughule, A., Routhu, T., Mandloi, N., Noronha, V., Joshi, A., ... & Prabhash, K. (2018). Validation of liquid biopsy: plasma cell-free DNA testing in clinical management of advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy*, 9, 1.

- Vezzulli, L., Stagnaro, L., Grande, C., Tassistro, G., Canesi, L., & Pruzzo, C. (2018). Comparative 16SrDNA gene-based microbiota profiles of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a shellfish farm (Ligurian Sea, Italy). *Microbial ecology*, 75(2), 495-504.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., & Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3), 281-300.
- Vidal, J., Berrocoso, M., & Fernández-Ros, A. (2012). Study of tides and sea levels at Deception and Livingston islands, Antarctica. *Antarctic Science*, 24(2), 193.
- Waldbusser, G. G., Hales, B., Langdon, C. J., Haley, B. A., Schrader, P., Brunner, E. L., ... & Gimenez, I. (2015). Saturation-state sensitivity of marine bivalve larvae to ocean acidification. *Nature Climate Change*, 5(3), 273-280.
- Wang, L., Yue, F., Song, X., & Song, L. (2015). Maternal immune transfer in mollusc. *Developmental & Comparative Immunology*, 48(2), 354-359.
- Wang, Y. J., Burand, J. P., & Jehle, J. A. (2007). Nudivirus genomics: diversity and classification. *Virologica Sinica*, 22(2), 128-136.
- Wetterstrand, K. A. (2013). DNA sequencing costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP). National Human Genome Research Institute 2013.
- Whittle, E., Leonard, M. O., Harrison, R., Gant, T. W., & Tonge, D. P. (2019). Multi-method characterization of the human circulating microbiome. *Frontiers in microbiology*, 9, 3266.
- Wittmann, A. C., & Pörtner, H. O. (2013). Sensitivities of extant animal taxa to ocean acidification. *Nature Climate Change*, 3(11), 995-1001.
- Wong, A. I., & Lo, Y. D. (2015). Noninvasive fetal genomic, methylomic, and transcriptomic analyses using maternal plasma and clinical implications. *Trends in molecular medicine*, 21(2), 98-108.
- y Baena, R., & Thébault, H. (2007). CIESM Mediterranean Mussel Watch Program Phase II: towards an increased awareness of marine environment and seafood quality. In *CIESM Workshop Monographs* (No. 31, pp. 87-89).
- Yu, S., Wang, Y., Li, X., Yu, F., & Li, W. (2017). The factors affecting the reproducibility of micro-volume DNA mass quantification in Nanodrop 2000 spectrophotometer. *Optik*, 145, 555-560.
- Yue, F., Zhou, Z., Wang, L., Ma, Z., Wang, J., Wang, M., ... & Song, L. (2013). Maternal transfer of immunity in scallop *Chlamys farreri* and its trans-generational immune protection to offspring against bacterial challenge. *Developmental & Comparative Immunology*, 41(4), 569-577.
- Zhang, R., Nakahira, K., Guo, X., Choi, A. M., & Gu, Z. (2016). Very short mitochondrial DNA fragments and heteroplasmy in human plasma. *Scientific reports*, 6, 36097.

Zhang, Y., Yamamoto-Kawai, M., & Williams, W. J. (2020). Two decades of ocean acidification in the surface waters of the Beaufort Gyre, Arctic Ocean: effects of sea ice melt and retreat from 1997–2016. *Geophysical Research Letters*, 47(3), e60119.

Zhou, Z., Wang, L., Song, L., Liu, R., Zhang, H., Huang, M., & Chen, H. (2014). The identification and characteristics of immune-related microRNAs in haemocytes of oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One*, 9(2).

Zink, F., Magnusdottir, D. N., Magnusson, O. T., Walker, N. J., Morris, T. J., Sigurdsson, A., ... & Stefansson, K. (2018). Insights into imprinting from parent-of-origin phased methylomes and transcriptomes. *Nature genetics*, 50(11), 1542-1552.

9. ANNEXE 1

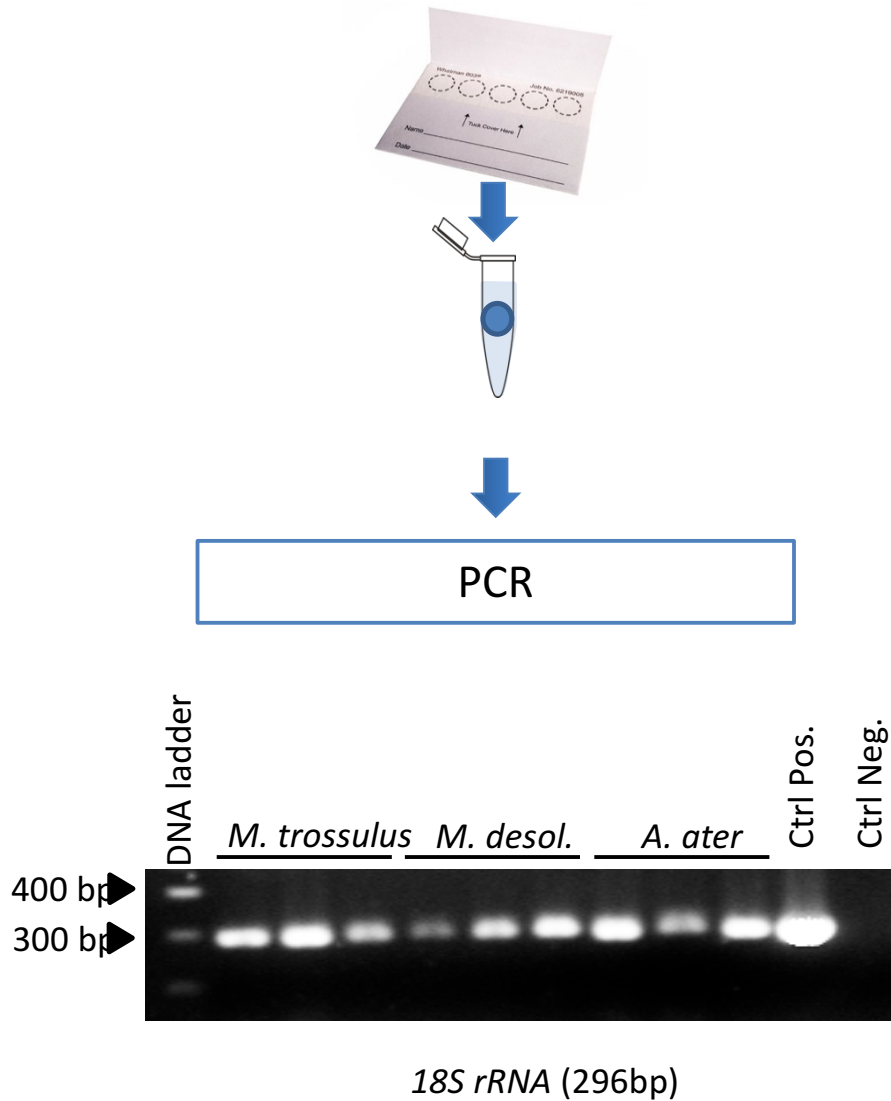
COMPARAISON DE DIFFÉRENTES MÉTHODES D'EXTRACTION DE L'ADN CIRCULANT DE L'HÉMOlymphe

Moule	Trousse	n	Punch (mm) ou Vol. Hémolymphe (μ l)	Concentration (μ g/ml)	ADN Total (ng)	Ecart type
<i>M. edulis</i> sp. 4°C	Nucleosnap	17	1500 μ l	1.14	57.0	0.67
<i>M. desolationis</i> 8°C	DNA Inv Kit	9	5mm = 10.36 μ l	0.366	47.5	0.239
<i>A. ater</i> 8°C	DNA Inv Kit	10	5mm = 10.36 μ l	0.496	29.8	0.395
<i>M. edulis</i> sp. 4°C	DNA Inv Kit	10	70 μ l hémolymphe fraîche	3.22	193.2	1.19

Différentes techniques d'extraction du ccfDNA. La méthode basée sur la trousse Nucleosnap requiert de l'hémolymphe liquide alors que la méthode basée sur La trousse DNA Investigator s'adapte aux cartes FTA ou à l'hémolymphe liquide.

10. ANNEXE 2

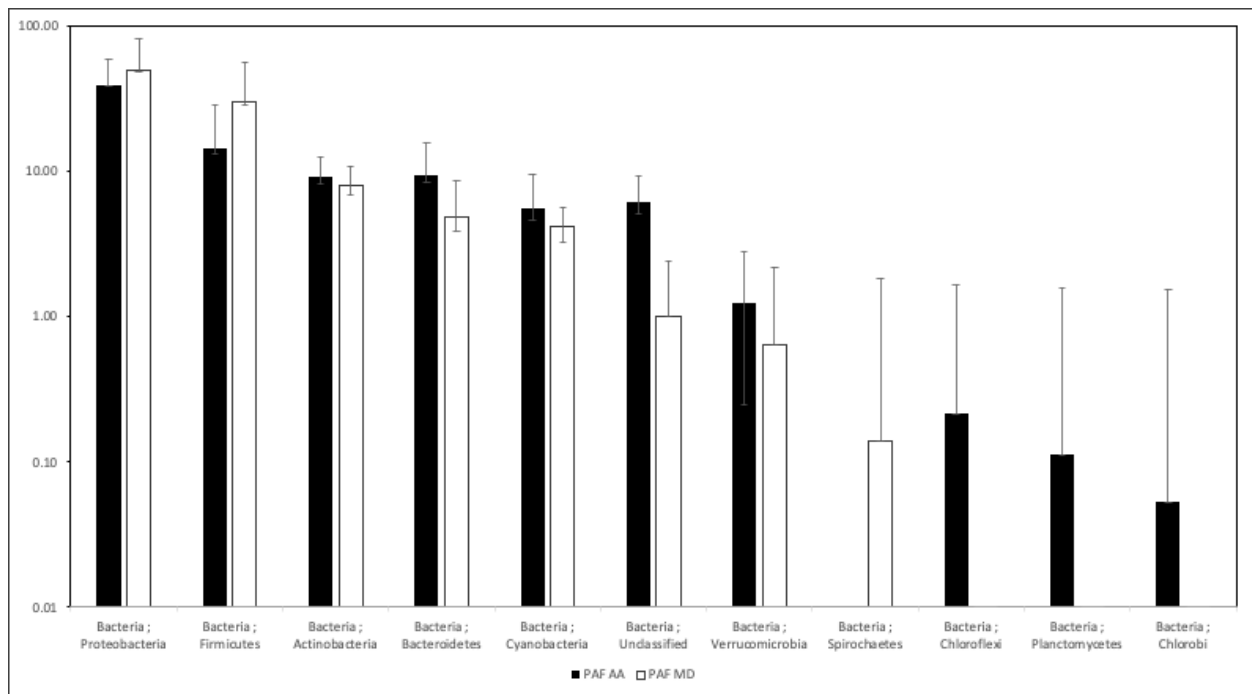
AMPLIFICATION DE L'ADN À PARTIR D'UN PUNCH DE CARTE FTA



Amplification d'acides nucléiques de type PCR directement à partir d'un disque FTA.

11. ANNEXE 3

RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES COMPARATIFS DU MICROBIOTE DE *A. ATRA* ET *M. DESOLATIONIS* PROVENANT DE LA MÊME MOULIÈRE (Port-aux-Français, Kerguelen)



	<i>M. desolationis</i>	<i>A. ater</i>
Simpson Dominance	.3651	.3101
Shannon Entropy	1.2397	1.4410

Résultats préliminaires de l'analyse comparative du microbiote (phylum) de l'hémolymphe de moules de Port aux Français.

12. ANNEXE 4

BIOSURVEILLANCE DES CHANGEMENTS CLIMATIQUES ET DE LA POLLUTION DANS LES ÉCOSYSTÈMES MARINS : UNE REVUE SUR LA MOULE SENTINELLE *AULACOMYA ATER*

Caza, F., Cledon, M., & St-Pierre, Y. (2016). Biomonitoring climate change and pollution in marine ecosystems: a review on *Aulacomya ater*. *Journal of Marine Biology*, 2016.

Review Article

Biomonitoring Climate Change and Pollution in Marine Ecosystems: A Review on *Aulacomya ater*

France Caza,¹ Maximiliano Cleidon,^{2,3} and Yves St-Pierre¹

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

²INRS-ETE, 490 rue de la Couronne, Quebec, QC, Canada G1K 2A9

³IIMyC-CONICET, 3350 Funes, Mar del Plata, Argentina

Correspondence should be addressed to Yves St-Pierre; yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

Received 10 April 2016; Accepted 31 July 2016

Academic Editor: Yehuda Benayahu

Copyright © 2016 France Caza et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The sedentarism and wide global distribution of the blue mussel *Mytilus edulis* have made it a useful bioindicator to assess changes in the health status of the marine ecosystem in response to pollution and other environmental stresses. Effective biomonitoring of an ecosystem requires, however, that multiple biomarkers be used to obtain an accurate measure of the cumulative effects of different sources of environmental stress. Here, we provide a first integrated review of the biological, economical, and geographical characteristics of another species of mussels, the ribbed mussel *Aulacomya ater*. We discuss the use of *Aulacomya ater* as a complementary biomonitor to the blue mussel to assess the impact of pollutants and climate change. Recent findings have indeed shown that *Mytilus edulis* and *Aulacomya ater* have distinctive anatomy and physiology and respond differently to environmental stress. Monitoring of mixed beds containing blue and ribbed mussels may thus represent a unique opportunity to study the effect of environmental stress on the biodiversity of marine ecosystems, most notably in the Southern hemisphere, which is particularly sensitive to climate change and where both species often cohabitate in the same intertidal zones.

1. Introduction

Historically known as the Magellan mussel, *Aulacomya atra* (*A. ater*) belongs to the genus *Aulacomya*. Today, this mussel species is commonly known as “cholga” in Chile and Argentina and as “ribbed mussel” in South Africa and other countries. The New Zealand form (*Aulacomya maoriana*) is smaller than its South American counterpart and has a finer radial sculpture, suggesting that it could be a distinct species [1]. It should not be confused with *Geukensia demissa*, a native mussel species from the Atlantic coast of North America also commonly called “ribbed mussel.” In South America and South Africa, the presence of *A. ater* is found on Pleistocene deposits, suggesting it has been in these regions for at least 2 million years [2]. It has probably evolved from *Aulacomya anderssoni*, which originated from the Antarctic during the Paleocene-Early Oligocene [3]. Its dispersion is likely to have been favored by kelp-rafting of juvenile and/or adult individuals and not by an anthropogenic dispersal mechanism [2].

A. ater is well known for its presence in deep water. In Punta Arenas Cove in Chile, for instance, natural banks of *A. ater* are found at depths of 15 m to more than 30 m, where temperatures vary from 12 to 16°C [4] (Figure 1). *A. ater* is also commonly found in nearshore kelp-bed communities and algae holdfasts in Central Chile, subantarctic and Antarctic waters [5–7] and South Africa [8]. We found some specimens in the cold and deep water of Port-aux-Français, in the Kerguelen Islands.

2. Anatomical Features of *Aulacomya ater*

In contrast to other mussel species, such as *M. edulis* and *M. galloprovincialis*, which have been studied in detail for many years, descriptions of anatomical features of *A. ater* remain relatively scarce. The biomechanical properties of its byssus have been reported by Troncoso et al. [9] but without comparison with other mussels species. Bivalves are well known to have a wide range of sensory organs for orientation, synchronization of gamete emission, and



FIGURE 1: *Aulacomya ater*. A specimen of *A. ater* collected in the deep subtidal water at Port-aux-Français, in the Kerguelen Islands.

mechanical reception of water currents [10]. They are also known to have light-sensitive cephalic and (in more evolved species) pallial eyes that are used to measure proximal light intensities emitted from different directions [11]. Zaixso et al. [12] have shown that *A. ater* has distinct anatomical and histological features with regard to its sensory organs. While the cephalic eyes are highly uniform among bivalves, the pallial eyes are structurally more varied and are localized on the outer, middle, or inner mantle folds. *A. ater* has a paired “pallial sense organ” that has no equivalent in *Mytilus* [12]. These eyes are located in the suprabranchial chamber of the pallial cavity, extending from the base of the foot to the anus, on the posterior adductor muscle.

3. Reproductive Cycle and Growth

In Northern Chile, *A. ater* spawns more than once a year, with variable intensities. The most intense spawning periods occur at the end of October/early November and during December/February, which coincide with periods of lower daily temperatures (recorded at 16 m depth) [4]. But spawning still occurs in winter (end of May/end of July). In Southern Chile, continuous gamete release has been reported over several months during the year, with clear peaks of prespawning stages in April (fall), August (early spring), November, and February (summer); this coincides with fluctuations in phytoplankton levels [20]. In females, the spawning stage peaks in July and December, while males release gametes from May to January [20]. Compared to other species, however, *A. ater* grows more slowly under optimal conditions and its growth is proportionally more sensitive to exposure to air than is the case for *M. galloprovincialis* [21, 22]. For example, while the growth rate of *A. ater* is approximately 35–40 mm in the first four years, that of *M. galloprovincialis* is approximately 70 mm for the same period of time. Moreover, while *M. galloprovincialis* is basically unaffected to continuous exposure to air for a period of one week, nearly all *A. ater* mussels will die following such an exposure [21]. To attain a minimum commercial size of 50 mm, *M. chilensis* will thus take approximately 7–8 years while *A. ater* will take 8–10 years, although the growth rate may vary depending of the regions and temperatures [23]. Thus Griffiths and King [24] reported a much faster growth

of *A. ater* at Ouderkraal, located just South of Cape Town in South Africa.

4. Geographical Distribution

The distribution of *A. ater* is widespread in both the Atlantic and Pacific coasts of South America, the Falkland Islands, and the Kerguelen Islands [2]. It is also found in a variety of different coastal environments (estuaries, harbors, sheltered, and exposed rocky shores) in New Zealand. *A. ater* is present along the Pacific Ocean from El Callao, Peru, to the Strait of Magellan in Chile, extending along the Atlantic Ocean from the south of Argentina to the south of Brazil. It is also present along the Atlantic coast of Africa, from Rocky Point in Northern Namibia to Port Alfred in the southeastern coast [8]. It is completely absent in the Northern hemisphere, although its presence has been reported in 1994 and 1997 in the deep water of the Moray Firth in Scotland, possibly following the passage of ships or barge hulls originating from South America [25]. The southernmost limits of its distribution are in the Beagle Channel (Tierra del Fuego, Argentina) and in the Kerguelen Islands, where they inhabit the intertidal and subtidal zones (Figure 2) [26].

5. Population Dynamics

A. ater used to dominate the lower midlittoral banks in Patagonia. There are increasing indications, however, that it is gradually disappearing there. At least three reasons may explain such decline: (1) changes in the climate of marine ecosystems; (2) competition with invasive alien mussel species; and (3) shifts in the commercial production of mussels. For instance, its population has severely declined in many areas of South America, as suggested by the observed declines from natural banks in Peru and Patagonia during severe El-Nino Southern Oscillation (ENSO) or following competition with *B. rodriguezii* [20, 27, 28]. In Chile, its culture has declined steadily from 1991, being replaced by *M. chilensis* [29]. In 2014, it represented less than 2,000 tons as compared to more than 20 000 tons in the 70s–90s and more than 220,000 tons for *M. chilensis*. In South Africa, where *A. ater* is indigenous, its existence is compromised in many areas by the presence of alien species, such as the Mediterranean *M. galloprovincialis*, which was introduced in South Africa in the late 1970s and represents now the most abundant mussel species in South Africa [30]. Such dominance by *M. galloprovincialis* on exposed and semiexposed shores is attributed to multiple factors, including a faster growth rate and a higher resistance to exposure to air, compared to *A. ater* [22]. Only on sheltered shores is *A. ater* able to resist the increasing dominance of *M. galloprovincialis* [30]. The geographic overlap between *A. ater* and *M. galloprovincialis* is almost complete and both are often in the same intertidal zones. Because of its significantly higher filtration rate (approximately 3–4 times that of *A. ater*), its resistance to air exposure, and its faster growth rate and higher reproductive output, *M. galloprovincialis* threatens the existence of *A. ater* [30]. The coastline of South Africa is not the only site where *A. ater* faces competition. On the beach of Puerto Madryn, in Patagonia, up to four species of

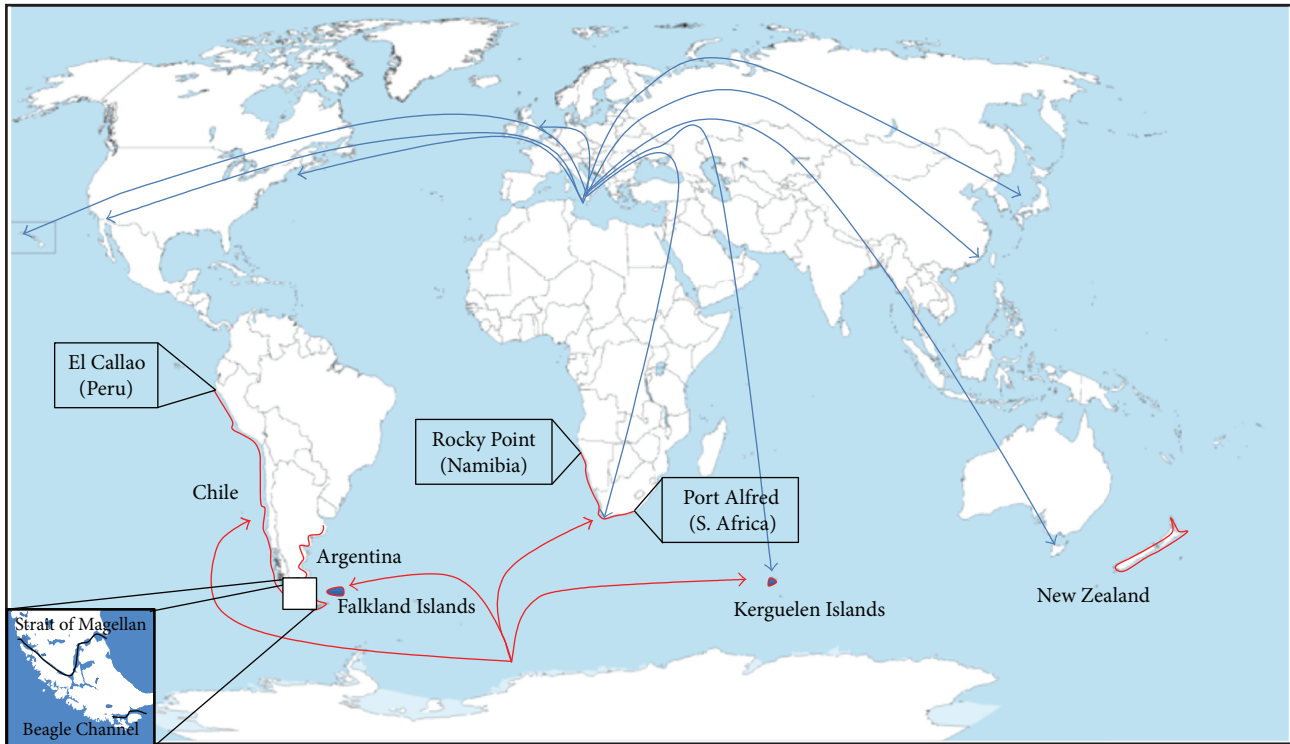


FIGURE 2: Global distribution of *Aulacomya ater*. In red, hypothetical origin of *A. ater* from Antarctic coasts and actual coastal distribution of *A. ater*. In South America, it is found in Chile, Peru, and Argentina. It is also found on the Atlantic coast of South Africa, in the Kerguelen Islands (Port-aux-Français and other sites), New Zealand, and the Falkland Islands. In blue, invasion of the mediterranean *M. galloprovincialis* worldwide (adapted from [30]). *M. galloprovincialis* has colonised and formed naturalised populations at nine localities outside of its native range. These include Hong Kong, Japan, Korea, Australia, America, Mexico, Canada, Great Britain, and Ireland. *M. galloprovincialis* has been listed as one of the World's Worst 100 Invasive Alien Species (GISD 2012).

native mussels are found at the same site, including *A. ater*, *M. edulis*, *Perumytilus purpuratus*, and *Brachidontes rodriguezii* [31]. Mixed beds of *A. ater*, *Choromytilus*, and others have also been reported on the rocky intertidal shore of Central and Southern Chile [32]. Our team found mussel intertidal beds containing approximately equal numbers of *M. desolationis* and *A. ater* at Port-aux-Français, in the Kerguelen Islands [33] (Figure 3). To our knowledge, however, there is no data showing that such diversity is permanently maintained as in the previous cases. It is logical to believe, however, that the presence of pollutants or other sources of stress may alter such equilibrium. For example, when compared to other mussels species, *A. ater* has been shown to be very sensitive to copper when measuring mortality following exposure to concentrations of 62.6–125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 48 h whereas other mussel species, such as *Choromytilus chorus*, have shown higher copper tolerance [34]. This equilibrium may also be threatened by distinct sensitivity to diseases, such as leukemia. This epidemic transmissible disease is caused by the insertion of retroviral sequences in the genome of the mussels and has recently been shown to spread horizontally [35, 36]. It is well known to affect many bivalves species, including *Mya arenaria* and *Mytilus* spp. Whether *A. ater* is more sensitive or resistant than other bivalves to the development of leukemia is currently unknown.

6. *A. ater* as a Sentinel Organisms for Marine Ecosystems

Marine bivalves have long been recognized as good biological indicators for monitoring the presence of a wide range of xenobiotics in marine environments. They are also used to monitor the effect of climate change. Although the majority of studies have used *M. edulis* as a sentinel organism to measure the presence of contaminants in marine ecosystems, several studies have used *A. ater* for assessing exposure and effect of pollutants in mussels [37]. In Northern Patagonia, where *A. ater* forms extensive beds on the rocky shores along the Patagonian coast of Argentina [38], this species has been used to monitor levels of metals (Fe, Cd, Zn, etc.) and activation of antioxidant enzymes. The authors found that the concentration of metals in the gills of *A. ater* varies according to the seasons, an observation similar to that which has been previously made with *M. galloprovincialis* [39, 40]. Measurement of the enzymatic activity of acetylcholinesterase present in the hemolymph has also shown to be potentially useful to detect the presence of low concentrations of organophosphate pesticides. Furthermore, *A. ater* has also been used for assessing the presence of cadmium in polluted marine environments on a more than 2000-kilometer-long coastline that extends from Walvis Bay



FIGURE 3: Mixed bed of *M. desolationis* and *A. ater*. The specimens were found in mixed beds located at Port-aux-Français in the Kerguelen Islands. On the left, the blue mussel *M. desolationis*. Each valve is elongated with a relatively smooth external surface that displays concentric growth rings. The anterior end is pointed and the posterior end is well rounded. The dorsal margin is convex and the ventral is weakly concave. On the right, *A. ater*, also known as the ribbed mussel, or Cholga or Cholgua, in South America. Its shell is multiform, with a concave ventral edge in most of the specimens. The dorsal edge is notoriously more prominent towards the rear half leaflet. Externally, it presents concentric grooves growth and marked ribs radials with band width decreasing progressively with increasing size.

in Namibia to Port Alfred on the coastline of South Africa [37]. In Chile and Argentina, *A. ater* is often used as a sentinel species to detect the bioaccumulation of pollutants, such as copper or cadmium, or toxic chemicals at different sites or following seasonal variations [14, 41–44]. It has also been used to study the disruptive effect of the natural estrogen E2 on male and female bivalves [45]. Natural hormones, such as 17β -estradiol (E2), are well known for their potent endocrine disrupting effects on marine organisms and are released in the marine environment via domestic effluents [46, 47], livestock manure [48], and agricultural runoff [49]. A study in Argentina has also shown that *A. ater* can be used to monitor pollution from urban sewage [31]. The authors have shown that *A. ater*, *M. edulis*, and other bivalves (*Perumytilus purpuratus* and *Brachidontes rodriguezii*) seem to be equally sensitive to pollution by sewage [50]. Up to now, however, most of the biomarkers have been developed using *M. edulis* as the sentinel species. In the case of *A. ater*, most of the stress biomarkers have been focused on cellular (phagocytosis, apoptosis, oxygen consumption, oxidative damage, ammonia excretion, and lipid radicals) or enzymatic (acetylcholinesterase, superoxide dismutase, catalase, and glutathione S-transferase) activities [14, 33, 38, 51, 52]. Our knowledge of its immune functions also remains limited. Yet, biomarkers of the immune response are emerging as being extremely useful sentinels to monitor environmental stress in marine ecosystems. Only recently have we been able to get a glimpse of hemocyte functions in *A. ater* and the effect of cadmium or acute thermal stress in their viability and phagocytic activities [33]. The description of genes or sequence data in the case of *A. ater* also remains anecdotic at best or has been restricted to descriptions of partial DNA sequences aimed at rapidly identifying mussel species present in food products [53]. Yet, the use of

TABLE 1: Comparison of heavy metal mean content in whole *A. ater* with related bivalves.

	Cd	Cr	Pb	Cu	Zn	Mn	Mn
<i>A. ater</i>	1.7 ^a	2.5 ^a	7 ^a	0.575 ^b	13650 ^b	0.84 ^b	0.31 ^b
<i>M. chilensis</i>	1.5 ^a	2 ^a	4 ^a	0.67 ^b	15.7 ^b	2.85 ^b	—
<i>M. edulis</i>	1.26 ^c	—	—	0.98 ^c	61 ^c	44.7 ^f	5 ^f
<i>M. galloprovincialis</i>	1.3 ^d	1.6 ^d	18 ^d	21 ^d	183 ^d	14.1 ^e	56.3 ^e

Values are given in $\mu\text{g/g}$ dry weight. Data was taken from Tapia et al., 2010 [13] ^a(Chili), Di Salvatore et al., 2013 [14] ^b(Argentina), Phillips, 1976 [15] ^c(Australia), Birch and Apostolatos, 2013 [16] ^d(Australia), Catsiki and Florou, 2006 [17] ^e(Greece), Szefer et al., 2002 [18] ^f(Baltic Sea), and España et al., 2007 [19] ^g(Chili).

A. ater as a sentinel species may provide some interesting benefits since it is one of the rare mussel species that is found in both subtidal and intertidal habitats, a property that could be very useful to assess the effect of environmental stress in two physically distinct habitats at a single site. Such difference in habitat is believed to explain the different sensitivity to copper and cadmium between *A. ater* and *Perumytilus purpuratus* in the Bay of Coliumo in Chile [41]. Because such distinct habitat is likely to make a difference in exposure, ingestion rates, and overall bioenergetics, it may also explain why the accumulation of toxins, such as paralytic shellfish poison, is less variable in *A. ater* than in *M. chilensis* [54]. Comparing the amounts of metals reported for *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, and *A. atra* (Table 1), the last species has a similar rate of accumulation and can be seen as an ecological equivalent from this point of view. Moreover, both genera have similar life span, reproductive cycles, and growth functions. In consequence they can be used equivalently to compare individuals of the same size. *A. ater* could be especially useful to monitor the impact of CC given its distinct physiology, reproductive cycle, and response to thermal stress when compared to other commonly used sentinel species. For example, it could be a convenient indicator of stressors that have limited impact on sentinel blue mussels. Such complementarity in biomarkers can provide significant benefits for monitoring of complex and high-risk ecosystems with borderline climatic conditions, such as the Kerguelen Islands.

7. Impacts of Climate Change and Pollution on Mixed Mussel Beds with *A. ater*

After changes in climatic conditions, invasive plants and animals are among the greatest threats to ecological diversity. Because they provide a habitat for other benthic macroinvertebrates, mussels are essential to maintain interrelatedness and persistence of associated organisms in aquatic ecosystems. Any major disturbance in their populations may thus have severe consequences in the biodiversity of these ecosystems. In North America, for example, Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*), which were transported from Europe to North America in the ballast water of ships in the mid-eighties, have been shown to negatively impact aquatic ecosystems by harming native organisms by

outcompeting other filter feeders or by adhering to shells of native mussels, turtles, and crustaceans [55]. Another example of invasion is the introduction in the Parana basin of an even more dangerous species, *Limnoperna fortunei*, which has a glochidia larvae that can attach to fishes to be transported upstream [56]. According to The Global Invasive Species Database (GISD), however, the most aggressive alien mussel species is probably *M. galloprovincialis*, a native from the Mediterranean coast and the Black and Adriatic Seas. It has successfully invaded numerous marine coastal lines around the globe, most notably those near important seaports where ship hull fouling and transport of ballast water are suspected to release alien mussel species [30]. A case in point is its dominance over the indigenous *A. ater* in South Africa. The question therefore arises as to whether climate change could exacerbate or revert the ability of an alien species such as *M. galloprovincialis* to invade a region like South Africa. One could easily envisage that extreme desiccation of rocky intertidal ecosystems, caused by strong dry winds and low rainfall, would provoke a selective pressure on these mussel-dominated beds that will impact their biodiversity. Such effect might be irreversible since we now know that biodiversity helps protect ecosystems from extreme conditions. This could be particularly important at sites with a rich diversity, such as the Wellington Harbour, where the endemic ribbed mussel *A. maoriana* and *Perna canaliculus*, together with *M. galloprovincialis*, dominate the intertidal zone in terms of their cover and biomass [57], or in Southern Chile, where rocky intertidal are dominated by *Perumytilus purpuratus*, *Semimytilus algosus*, *M. edulis*, *M. chilensis*, *Choromytilus chorus*, *Brachidontes granulata*, and *Aulacomya ater* [28]. It is also plausible that climate change will impact the ability of mussels to escape the effects of natural control agents such as parasites. In South Africa, for instance, it is well known that *M. galloprovincialis* is particularly sensitive to *Mastigocoleus*, an endolithic cyanophyte that contributes to the mortality of young (less than 40 mm shell length) *M. galloprovincialis* by weakening its shell at the point where the adductor muscle is attached and shell repair is impossible [58]. Because *A. ater* is less sensitive to *Mastigocoleus*, any environmental changes that favor the propensity of this bacteria will put *M. galloprovincialis* at a disadvantage relative to *A. ater*. In contrast, conditions that would favor growth of Polychaetes may have a more detrimental effect on *A. ater* than on *M. edulis*. While weak infestation by Polychaetes is usually not a threat for bivalves, heavy infestation can cause serious shell damage, reduce growth, and impair reproduction. The rough surface of the valves of *A. ater*, compared to smooth periostracum of *M. edulis*, probably explains why it is much more sensitive to polydora (*Polydora rickettsii*) infestation [59].

Another factor to consider is how climate change will affect the vulnerability of mussels to predators, which play a critical role in the control of the structure and diversity of local mussel beds [60]. As suggested by Griffiths and Hockey [61], because predators attack younger and smaller mussels, *M. galloprovincialis* is less susceptible to predation compared to *A. ater*, which has a significantly lower growth rate in exposed and semiexposed sites [21]. However, because

A. ater has a significantly higher growth rate in sheltered sites, changes in the sea level that would impact the physical habitat of the mussel bed may favor *A. ater*, although one may argue that predation is likely to be more intense at sheltered sites. The rock-lobster is another predator that is particularly sensitive to environmental factors such as water temperatures, strength of the Leeuwin Current, and westerly winds [62, 63]. The scarce distribution of *A. ater* at Malgas Islands is indeed attributed to intense predation by rock-lobsters [64]. Changes in the population of *Nucella cingulata*, commonly found on the coast of South Africa, may also have a strong influence on the biodiversity of mixed beds with *A. ater* since this sea snail drills wider boreholes and preferentially selects bigger mussels such as *A. ater* [65].

8. Economical Perspective

Aquaculture is a rapidly growing economic sector that has shown a steady increase over the last 50 years [66]. According to a report published in 2013 by Transparency Market Research, the global market for aquaculture was valued at \$135.10 billion in 2012 and is expected to reach \$195.13 billion in 2019. Aquaculture provides half of the seafood products worldwide. Production of mussels is the third most important among bivalves, after clams and oysters, reaching approximately 1.5 million tons in 2010. This market is largely dominated by the blue mussels, which have a wide geographical distribution and which have been cultured by intertidal wooden poles for several centuries in Europe. Given the extreme southern geographical distribution of *A. ater*, its production is much more limited. Historically, the production of *A. ater* has been exclusively derived from artisanal capture methods along the coast of Chile. Its commercial potential had steadily grown since the end of 1950s, reaching a plateau of approximately 15 000 to 20 000 tons in the seventies [67]. This method has been gradually replaced by aquaculture production. Production of *A. ater* is usually done using suspended systems and takes 14–24 months before harvest [68]. Despite such new methods, over the last 15–20 years, its overall production has steadily declined (<http://www.fao.org/fishery/species/3533/en>) [69]. In 2005, the production of *A. ater* barely reached 800 tons. This is extremely low compared to productions of *M. edulis* and *M. galloprovincialis* (approximately 400 000 and 115 000 tons, resp.) [70]. In South America, the production of *M. chilensis* reaches more than 80 000 tons, exceeding hundredfold that of *A. ater*. In countries such as Chile, where mussel production concentrates around three distinct species, *M. chilensis*, *Choromytilus chorus*, and *A. ater*, and exceeds that of the Pacific oyster and the Northern scallop, the industrial development and the greatest commercial potential are now focused on *M. chilensis* [26]. In 2010, the production of *M. chilensis* reached 221,522 tons, 1,736 tons for *A. ater*, and 757 tons for *C. chorus*. Considering that the global market of bivalves is consistently increasing, reaching 13.6 millions metric tons (mt) in 2005, and that mussels dominate the global trade, it is clear that *A. ater* captures only a small share of the bivalve market taking into account consumer's preference for blue mussels.

A. ater, however, may still have some unexploited potential when considering the emergence of bioinspired engineering research for the development of innovative biotechnological applications. The global market for such plant and animal biological adhesives is believed to reach more than \$6 billion in 2019 (<http://www.marketsandmarkets.com/>). Like other mussels, *A. ater* possesses some highly developed macroadhesion mechanisms that are extremely efficient in a humid environment and that are necessary to resist the shear force of turbulent intertidal zones. A gland in the foot of byssus-forming mussels produces adhesive polyphenolic proteins rich in dopa, lysine, and other hydroxylated amino acids. These proteins, which have low immunogenicity and are nontoxic, biodegradable, and nonpolluting, have been considered as potentially attractive for coating different types of surfaces for biotechnological usage, including immobilization of antigens on solid support for ELISA testing [71]. Compared to other mussels species, *A. ater* contains 15–20 times more adhesive polyphenolic proteins than any other mussels [72]. Protocols aimed at optimizing large scale production of these biological adhesive for their industrial usage have recently been developed and may accelerate the use of such bioinspired proteins in various biomedical and tissue engineering fields [73, 74].

9. Perspectives

Compared to *A. ater* and other mussel species, blue mussels have received much more attention from scientists and aqua farmers not only because their global production is increasing at a rapid pace, but also because it is found almost everywhere in the world and is capable of dominating indigenous mussel species, which will eventually face local and regional extinction. In contrast, *A. ater*, which has been historically a driving force in the economy of many countries, has seen its position in the global market of bivalves steadily declining in favor of other mussel species. This is largely due to several factors, including the fact that its geographical distribution is restricted to the Southern hemispheres and that its growth rate is slower than that of the blue mussel. For scientists, the wide distribution of blue mussels also makes it a very useful tool for monitoring the effect of environmental stress on marine ecosystems on a global scale. It is clear, however, that more attention needs to be paid to *A. ater*. Its progressive disappearance from the coast of South Africa is an indication of its sensitivity to the dominance by the blue mussels. Given its limited geographic distribution, one could wonder whether such dominance by the blue mussel may severely compromise the existence of *A. ater*. Whether climate change and pollution will exacerbate this trend is a question that deserves attention. Because of their distinctive anatomy and physiology, it is logical to believe that both species will respond differently to climate change and exposure to pollutants. Our recent comparative study between *A. ater* and *M. desolationis* supports this hypothesis [33]. Monitoring of mixed beds containing *A. ater* may thus represent a unique opportunity to study the effect of climate change and pollution on the biodiversity of marine ecosystems. In fact, a better knowledge of *A. ater* could provide a

new and complementary tool for monitoring global climate changes in marine ecosystems in the Southern hemispheres, which is particularly sensitive to climate change.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Stéphane Betoulle for helpful discussions and Dr. Edouard F. Potworowski for a critical reading of the paper.

References

- [1] A. G. Beu and J. I. Raine, *Revised Descriptions of New Zealand Cenozoic Mollusca from Beu and Maxwell*, vol. 27 of *GNS Science Miscellaneous Series*, 2009.
- [2] J. C. Castilla and R. Guíñez, “Disjoint geographical distribution of intertidal and nearshore benthic invertebrates in the Southern Hemisphere,” *Revista Chilena de Historia Natural*, vol. 73, no. 4, pp. 1–23, 2000.
- [3] J. A. Crame, “An evolutionary perspective on marine faunal connections between southernmost South America and Antarctica,” *Scientia Marina*, vol. 63, no. S1, pp. 1–14, 1999.
- [4] M. Avendaño and M. Cantillán, “Reproductive cycle of *Aulacomya ater* [Bivalvia: Mytilidae (Molina 1782)] in Punta Arenas Cove (Antofagasta Region, Chile),” *Aquaculture International*, vol. 22, no. 4, pp. 1229–1244, 2014.
- [5] F. P. Ojeda and B. Santelices, “Invertebrate communities in holdfasts of the kelp *Macrocystis pyrifera* from southern Chile,” *Marine Ecology Progress Series*, vol. 16, no. 1, pp. 65–73, 1984.
- [6] J. A. Vásquez and B. Santelices, “Comunidades de macroinvertebrados en discos adhesivos de *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta) en Chile central,” *Revista Chilena de Historia Natural*, vol. 57, pp. 131–154, 1984.
- [7] J. C. Castilla, “Food webs and functional aspects of the kelp, *Macrocystis pyrifera*, community in the Beagle Channel, Chile,” in *Antarctic Nutrient Cycles and Food Webs*, pp. 407–414, Springer, Berlin, Germany, 1985.
- [8] C. Van Erkom Schurink and C. C. L. Griffiths, “Marine mussels of southern Africa—their distribution patterns, standing stocks, exploitation and culture,” *Journal of Shellfish Research*, vol. 9, no. 1, pp. 75–85, 1990.
- [9] O. P. Troncoso, F. G. Torres, and C. J. Grande, “Characterization of the mechanical properties of tough biopolymer fibres from the mussel byssus of *Aulacomya ater*,” *Acta Biomaterialia*, vol. 4, no. 4, pp. 1114–1117, 2008.
- [10] B. Morton, “The evolution of eyes in the Bivalvia,” *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, vol. 39, pp. 165–205, 2001.
- [11] M. F. Land and D. E. Nilsson, *Animal Eyes*, Oxford University Press, New York, NY, USA, 2002.
- [12] H. E. Zaixso, “Nervous system and receptors in the ribbed mussel, *Aulacomya atra atra* (Bivalvia: Mytilidae),” *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, vol. 38, no. 2, pp. 43–56, 2003.
- [13] J. Tapia, L. Vargas-Chacoff, C. Bertrán et al., “Study of the content of cadmium, chromium and lead in bivalve molluscs of the Pacific Ocean (Maule Region, Chile),” *Food Chemistry*, vol. 121, no. 3, pp. 666–671, 2010.

- [14] P. Di Salvatore, J. A. Calcagno, N. Ortíz, M. D. C. Ríos de Molina, and S. E. Sabatini, "Effect of seasonality on oxidative stress responses and metal accumulation in soft tissues of *Aulacomya atra*, a mussel from the South Atlantic Patagonian coast," *Marine Environmental Research*, vol. 92, pp. 244–252, 2013.
- [15] D. J. H. Phillips, "The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals," *Marine Biology*, vol. 38, no. 1, pp. 59–69, 1976.
- [16] G. F. Birch and C. Apostolatos, "Use of sedimentary metals to predict metal concentrations in black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) tissue and risk to human health (Sydney estuary, Australia)," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 20, no. 8, pp. 5481–5491, 2013.
- [17] V.-A. Catsiki and H. Florou, "Study on the behavior of the heavy metals Cu, Cr, Ni, Zn, Fe, Mn and ^{137}Cs in an estuarine ecosystem using *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator species: the case of Thermaikos gulf, Greece," *Journal of Environmental Radioactivity*, vol. 86, no. 1, pp. 31–44, 2006.
- [18] P. Szefer, K. Frelek, K. Szefer et al., "Distribution and relationships of trace metals in soft tissue, byssus and shells of *Mytilus edulis* trossulus from the southern Baltic," *Environmental Pollution*, vol. 120, no. 2, pp. 423–444, 2002.
- [19] M. S. A. España, E. M. R. Rodríguez, and C. D. Romero, "Comparison of mineral and trace element concentrations in two molluscs from the Strait of Magellan (Chile)," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 20, no. 3-4, pp. 273–279, 2007.
- [20] R. Jaramillo and J. Navarro, "Reproductive cycle of the Chilean ribbed mussel *Aulacomya ater* (Molina, 1782)," *Journal of Shellfish Research*, vol. 14, no. 1, pp. 165–172, 1995.
- [21] P. A. R. Hockey and C. van Erkom Schurink, "The invasive biology of the mussel *Mytilus galloprovincialis* on the southern African coast," *Transactions of the Royal Society of South Africa*, vol. 48, no. 1, pp. 123–139, 1992.
- [22] C. van Erkom Schurink and C. L. Griffiths, "Factors affecting relative rates of growth in four South African mussel species," *Aquaculture*, vol. 109, no. 3-4, pp. 257–273, 1993.
- [23] J. Davenport and G. Davies, "A preliminary assessment of growth rates of mussels from the Falkland Islands (*Mytilus chilensis* Hupé and *Aulacomya ater* (Molina)), " *Journal du Conseil*, vol. 41, no. 2, pp. 154–158, 1984.
- [24] C. L. Griffiths and J. A. King, "Energy expended on growth and gonad output in the ribbed mussel *Aulacomya ater*," *Marine Biology*, vol. 53, no. 3, pp. 217–222, 1979.
- [25] D. W. McKay, *Aulacomya ater* (Molina, 1782)[Mollusca: Pelecypoda] collected from the Moray Firth. Porcupine Newsletter, 5, p. 23, 1994.
- [26] I. Uriarte, *Estado Actual del Cultivo de Moluscos Bivalvos en Chile*, FAO Actas de Pesca y Acuicultura, 2008.
- [27] P. W. Glynn, "El Niño-Southern Oscillation 1982-1983: nearshore population, community, and ecosystem responses," *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, vol. 19, no. 1, pp. 309–346, 1988.
- [28] J. C. Castilla and P. E. Neill, "Marine bioinvasions in the south-eastern Pacific: status, ecology, economic impacts, conservation and management," in *Biological Invasions in Marine Ecosystems*, pp. 439–457, Springer, Berlin, Germany, 2009.
- [29] SERNAPESCA, *Anuarios Estadísticos de Pesca*, Servicio Nacional de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, Santiago, Chile, 1991–2007.
- [30] G. M. Branch and C. Nina Steffani, "Can we predict the effects of alien species? A case-history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck)," *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 300, no. 1-2, pp. 189–215, 2004.
- [31] G. MacHado-Schiaffino, L. O. Bala, and E. Garcia-Vazquez, "Recovery of normal cytogenetic records in mussels after cessation of pollutant effluents in Puerto Madryn (Patagonia, Argentina)," *Estuaries and Coasts*, vol. 32, no. 4, pp. 813–818, 2009.
- [32] M. Fernández, E. Jaramillo, and P. A. Marquet, "Diversity, dynamics and biogeography of Chilean benthic nearshore ecosystems: an overview and guidelines for conservation," *Revista Chilena de Historia Natural*, vol. 73, no. 4, pp. 797–830, 2000.
- [33] F. Caza, S. Betoulle, M. Auffret, P. Brousseau, M. Fournier, and Y. St-Pierre, "Comparative analysis of hemocyte properties from *Mytilus edulis* desolationis and *Aulacomya ater* in the Kerguelen Islands," *Marine Environmental Research*, vol. 110, pp. 174–182, 2015.
- [34] M. Zuñiga, P. Vallejos, A. Larraín, and E. Bay-Schmith, "Toxicity of copper on four Chilean marine mussels," *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 71, no. 6, pp. 1167–1174, 2003.
- [35] G. Arriagada, M. J. Metzger, A. F. Mutray et al., "Activation of transcription and retrotransposition of a novel retroelement, Steamer, in neoplastic hemocytes of the mollusk *Mya arenaria*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, no. 39, pp. 14175–14180, 2014.
- [36] M. J. Metzger, C. Reinisch, J. Sherry, and S. P. Goff, "Horizontal transmission of clonal cancer cells causes leukemia in soft-shell clams," *Cell*, vol. 161, no. 2, pp. 255–263, 2015.
- [37] A. Darracott and H. Watling, "The use of molluscs to monitor cadmium levels in estuaries and coastal marine environments," *Transactions of the Royal Society of South Africa*, vol. 41, no. 4, pp. 325–338, 1975.
- [38] E. Giarratano, M. N. Gil, and G. Malanga, "Biomarkers of environmental stress in gills of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* (Nuevo Gulf, Northern Patagonia)," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 107, pp. 111–119, 2014.
- [39] D. Ivanković, J. Pavičić, M. Erk, V. Filipović-Marjić, and B. Raspor, "Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: seasonal and spatial variability," *Marine Pollution Bulletin*, vol. 50, no. 11, pp. 1303–1313, 2005.
- [40] S. Pytharopoulou, E. C. Kouvela, E. Sazakli, M. Leotsinidis, and D. L. Kalpaxis, "Evaluation of the global protein synthesis in *Mytilus galloprovincialis* in marine pollution monitoring: seasonal variability and correlations with other biomarkers," *Aquatic Toxicology*, vol. 80, no. 1, pp. 33–41, 2006.
- [41] C. Espinoza, R. Diaz, and M. Zuñiga, "Toxicidad aguda y crónica de cobre y cadmio sobre dos especies de mitilidos: *Perumytilus purpuratus* y *Aulacomya ater*," *Ciencia y Tecnología del Mar*, vol. 26, pp. 73–78, 2003.
- [42] C. Espinoza, A. Camaño, and R. Díaz, "Spatial and temporal comparison of copper bioaccumulation in the mussel *Aulacomya ater* (Molina) from Jorgillo location (23° 45'S; 79° 27'W) and Dichato location (36° 32'S; 71° 56'W)," *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 73, no. 6, pp. 1049–1056, 2004.
- [43] M. N. Gil, A. Torres, M. Harvey, and J. L. Esteves, "Metales pesados en organismos marinos de la zona costera de la

- Patagonia argentina continental,” *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, vol. 41, no. 2, pp. 167–176, 2006.
- [44] K. Pozo, P. Kukučka, L. Vaňková et al., “Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in concepción bay, central Chile after the 2010 Tsunami,” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 95, no. 1, pp. 480–483, 2015.
- [45] L. Saavedra, M. Leonardi, V. Morin, and R. A. Quiñones, “Induction of vitellogenin-like lipoproteins in the mussel *Aulacomya ater* under exposure to 17 β -estradiol,” *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, vol. 47, no. 3, pp. 429–438, 2012.
- [46] F. Gagné, C. André, and C. Blaise, “Increased vitellogenin gene expression in the mussel *Elliptio complanata* exposed to estradiol-17 β ,” *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 14, no. 10, pp. 861–866, 2005.
- [47] F. Gagné, B. Bouchard, C. André, E. Farcy, and M. Fournier, “Evidence of feminization in wild *Elliptio complanata* mussels in the receiving waters downstream of a municipal effluent outfall,” *Comparative Biochemistry and Physiology—C Toxicology and Pharmacology*, vol. 153, no. 1, pp. 99–106, 2011.
- [48] T.-S. Chen, T.-C. Chen, K.-J. C. Yeh et al., “High estrogen concentrations in receiving river discharge from a concentrated livestock feedlot,” *Science of the Total Environment*, vol. 408, no. 16, pp. 3223–3230, 2010.
- [49] L. S. Lee, N. Carmosini, S. A. Sassman, H. M. Dion, and M. S. Sepúlveda, “Agricultural contributions of antimicrobials and hormones on soil and water quality,” *Advances in Agronomy*, vol. 93, pp. 1–68, 2007.
- [50] J. I. Izquierdo, G. Machado, F. Ayllon et al., “Assessing pollution in coastal ecosystems: a preliminary survey using the micronucleus test in the mussel *Mytilus edulis*,” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 55, no. 1, pp. 24–29, 2003.
- [51] E. Führer, A. Rudolph, C. Espinoza, R. Díaz, M. Gajardo, and N. Camaño, “Integrated use of biomarkers (O:N ratio and acetylcholinesterase inhibition) on *Aulacomya ater* (Molina, 1782) (Bivalvia: Mytilidae) as a criteria for effects of organophosphate pesticide exposition,” *Journal of Toxicology*, vol. 2012, Article ID 951568, 6 pages, 2012.
- [52] E. Giarratano, M. N. Gil, and G. Malanga, “Assessment of antioxidant responses and trace metal accumulation by digestive gland of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* from Northern Patagonia,” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 92, pp. 39–50, 2013.
- [53] F. J. Santaclara, M. Espiñeira, A. G. Cabado, A. Aldasoro, N. Gonzalez-Lavín, and J. M. Vieites, “Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 22, pp. 8461–8470, 2006.
- [54] C. Molinet, E. Niklitschek, M. Seguel, and P. Díaz, “Trends of natural accumulation and detoxification of paralytic shellfish poison in two bivalves from the Northwest Patagonian inland sea,” *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, vol. 45, no. 2, pp. 195–204, 2010.
- [55] R. L. Cuhel and C. Aguilar, “Ecosystem transformations of the laurentian great lake michigan by nonindigenous biological invaders,” *Annual Review of Marine Science*, vol. 5, pp. 289–320, 2013.
- [56] D. Boltovskoy and N. Correa, “Ecosystem impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (golden mussel) in South America,” *Hydrobiologia*, vol. 746, no. 1, pp. 81–95, 2014.
- [57] J. G. Helson and J. P. A. Gardner, “Variation in scope for growth: a test of food limitation among intertidal mussels,” *Hydrobiologia*, vol. 586, no. 1, pp. 373–392, 2007.
- [58] S. C. Webb and J. L. Korrrübel, “Shell weakening in marine mytilids attributable to blue-green alga *Mastigocoleus* sp. (Nostochopsidaceae),” *Journal of Shellfish Research*, vol. 13, no. 1, pp. 11–17, 1994.
- [59] M. E. Diez, V. I. Radashevsky, J. M. Orensanz, and F. Cremonte, “Spionid polychaetes (Annelida: Spionidae) boring into shells of molluscs of commercial interest in northern Patagonia, Argentina,” *Italian Journal of Zoology*, vol. 78, no. 4, pp. 497–504, 2011.
- [60] A. Barkai and G. M. Branch, “Contrasts between the benthic communities of subtidal hard substrata at Marcus and Malgas islands: a case of alternative stable states?” *South African Journal of Marine Science*, vol. 7, no. 1, pp. 117–137, 1988.
- [61] C. L. Griffiths and P. A. Hockey, “A model describing the interactive roles of predation, competition and tidal elevation in structuring mussel populations,” *South African Journal of Marine Science*, vol. 5, no. 1, pp. 547–556, 1987.
- [62] N. Caputi, C. Chubb, R. Melville-Smith, A. Pearce, and D. Griffin, “Review of relationships between life history stages of the western rock lobster, *Panulirus cygnus*, in Western Australia,” *Fisheries Research*, vol. 65, no. 1–3, pp. 47–61, 2003.
- [63] N. Caputi, “Impact of the Leeuwin Current on the spatial distribution of the puerulus settlement of the western rock lobster (*Panulirus cygnus*) and implications for the fishery of Western Australia,” *Fisheries Oceanography*, vol. 17, no. 2, pp. 147–152, 2008.
- [64] A. Barkai and G. M. Branch, “Growth and mortality of the mussels *Choromytilus meridionalis* (krauss) and *Aulacomya ater* (molina) as indicators of biotic conditions,” *Journal of Molluscan Studies*, vol. 55, no. 3, pp. 329–342, 1989.
- [65] P. A. Wickens and C. L. Griffiths, “Predation by *Nucella cingulata* (Linnaeus, 1771) on mussels, particularly *Aulacomya ater* (Molina, 1782),” *Veliger*, vol. 27, no. 4, pp. 366–374, 1985.
- [66] S. E. Shumway, Ed., *Shellfish Aquaculture and the Environment*, vol. 424, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, 2011.
- [67] P. Cavero Cerrato and P. Rodríguez Pinto, *Producción Sostenida de Moluscos Bivalvos en el Perú: Acuicultura y Repoblamiento*, FAO Actas de Pesca y Acuicultura, FAO, 2008.
- [68] D. A. López, B. A. López, and M. L. González, “Shellfish culture in Chile,” *International Journal of Environment and Pollution*, vol. 33, no. 4, pp. 401–431, 2008.
- [69] C. S. Gallinato, *Modelling of productivity, water quality effects and profit optimization of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) farms: application of the FARM model and GIS in the Valdivia estuary of Chile [Ph.D. thesis]*, Universidade do Algarve, 2009.
- [70] A. Lovatelli, S. Vannuccini, and D. McLeod, “Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura,” in *Factores que afectan su sustentabilidad en América Latina; Taller Técnico Regional de la FAO, 20–24 de agosto de 2007 Puerto Montt, Chile; FAO Actas de Pesca y Acuicultura (FAO)*, A. Lovatelli, A. Farias, and I. Uriarte, Eds., pp. 45–59, FAO, División de Gestion de la Pesca y la Acuicultura, Rome, Italy, 2008.
- [71] V. A. Burzio, T. Silva, J. Pardo, and L. O. Burzio, “Mussel adhesive enhances the immobilization of human chorionic gonadotrophin to a solid support,” *Analytical Biochemistry*, vol. 241, no. 2, pp. 190–194, 1996.

- [72] L. O. Burzio, V. A. Burzio, T. Silva, L. A. Burzio, and J. Pardo, "Environmental bioadhesion: themes and applications," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 8, no. 3, pp. 309–312, 1997.
- [73] S. Lim, K. R. Kim, Y. S. Choi, D.-K. Kim, D. Hwang, and H. J. Cha, "In vivo post-translational modifications of recombinant mussel adhesive protein in insect cells," *Biotechnology Progress*, vol. 27, no. 5, pp. 1390–1396, 2011.
- [74] Y. S. Choi, Y. J. Yang, B. Yang, and H. J. Cha, "In vivo modification of tyrosine residues in recombinant mussel adhesive protein by tyrosinase co-expression in *Escherichia coli*," *Microbial Cell Factories*, vol. 11, no. 1, article 139, 2012.

13. ANNEXE 5

ANALYSE COMPARATIVE DES SÉQUENCES DU GÈNE HSP70 DE *MYTILUS DESOLATIONIS* ET D'*AULACOMYA ATER* DE KERGUELEN

Caza, F., Betoulle, S., Auffret, M., Brousseau, P., Fournier, M., & St-Pierre, Y. (2016). Comparative sequence analysis of Hsp70 gene from *Mytilus edulis desolationis* and *Aulacomya ater* of the Kerguelen Islands. *Journal of xenobiotics*, 6(2).

Comparative sequence analysis of Hsp70 gene from *Mytilus edulis desolationis* and *Aulacomya ater* of the Kerguelen Islands

F. Caza,¹ S. Betouille,² M. Auffret,³ P. Brousseau,¹ M. Fournier,¹ Y. St-Pierre¹

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada;

²Université Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 SEBIO Stress environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques, Reims, France;

³Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR CNRS 6539-LEMAR, Plouzane, France

Introduction

Circumpolar studies have provided strong evidence of the vulnerability of marine ecosystems in response to anthropogenic activities. Such ecological disturbances are particularly impactful on biodiversity, which helps protect ecosystems from extreme conditions. It is thus imperative to develop biomarkers for long term monitoring of changes in marine biodiversity and to better assess comparative responses of different species. Because of their wide geographic distribution and their seeding and filter-feeding nature, mussels, such as *Mytilus edulis* and its closely related species, have been commonly used as sentinel species in ecotoxicological monitoring programs around the globe.^{1,3} Extensive research has been performed on their physiology and their genetic content in order to develop sensitive and specific biomarkers. This is especially true for *M. edulis*, which has been extensively characterized at the cellular and molecular levels, not only because of their ecological importance, but also because of their economical impact.^{4,6} However, because of their distinctive anatomy and physiology, it is logical to believe that other mussel species will respond differently to climate change and exposure to pollutants.⁷ Our recent comparative study between *Mytilus desolationis* (*M. desolationis*) and *Aulacomya ater* (*A. ater*) supports this hypothesis.⁸ A better knowledge of *A. ater* could thus provide a new and complementary tool for monitoring global climate changes in marine ecosystems, most notably in the Southern hemisphere, which is particularly sensitive to climate change.

Because of its strategically geographical position, the Kerguelen archipelago is considered an important site to investigate the effects of global change on marine

ecosystems.⁹ Although *M. desolationis* is normally the dominant species in most mussel beds in the Kerguelen archipelago, we found that some mussel beds, such as one found at tide depth at Port-aux-Français, is largely dominated by *A. ater*.⁸ Whether such diversity is permanently maintained or will change following environmental perturbation will depend on the ability of mussel species to respond to environmental stress. Because heat shock proteins (Hsps) play an important role of protection and maintenance of many vital cellular functions in response to thermal and toxic stress, they are commonly used as stress biomarkers.^{10,11} Their structural features are highly conserved among eukaryotes and prokaryotes, especially in the case of hsp70, a widely used biomarker to monitor the impact of environmental factors on various animal species, including mussels.¹²⁻¹⁶ Unfortunately, while a considerable amount of data exists on blue mussel stress response genes, our knowledge on *A. ater* remains fragmentary. In the present work, we report a detailed comparative analysis of *hsp70* stress response gene from *Mytilus desolationis* (*M. desolationis*) and *Aulacomya ater* (*A. ater*).

Materials and Methods

Collection of specimens

Adult specimens (55–70 mm length) of blue mussels, *M. edulis desolationis*, and ribbed mussels, *A. ater* were collected on the intertidal rocky shore of Port-aux-Français (Kerguelen Islands, France). Mussels were immediately transferred to the marine laboratory of Port-aux-Français and placed in a temperature-controlled (12°C) aerated aquarium containing filtered recirculating seawater maintained on a 12 h:12 h light/dark cycle. Mussels were dissected, tissues frozen in liquid nitrogen, and stored at –80°C until further analysis.

RT-PCR and sequencing

Tissues (gills) were homogenized by sonication and total cellular RNA was isolated using the TRIzol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Ultraviolet (UV) absorbance was used to assess the quality and the concentrations of RNA. First-strand cDNA was prepared from cellular RNA using the reverse transcriptase Omniscript (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). cDNAs were amplified using specific primers (Table 1) with the following conditions: 94°C for 3 min, followed by 30 to 35 cycles of the following: 94°C for 40 sec, 60°C for 40 sec (unless otherwise indicated), and 72°C for 40 sec, followed by a final extension step at 72°C for 10 min. PCR was performed in

Correspondence: Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. Des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7. Tel.: 450.686.5354 - Fax: 450.686.5501. E-mail: yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

Key words: Hsp70; mussels; *Aulacomya ater*; *Mytilus desolationis*; Kerguelen.

Acknowledgments: the authors would like to thank Ms. Marlène Fortier and M. Philippe Egesborg for their technical help, all the personnel from the French Polar Institute Paul Emile Victor (IPEV) for their logistic support, and Vincent Terol, Jean-François Laclavetine and Didier Boutenet for their kind help and hospitality during our stay in the Kerguelen archipelago.

Funding: Supported by the National Science and Engineering Council of Canada (NSERC), the Agence Nationale de la Recherche (ANR), the French Polar Institute Paul Émile Victor (IPEV, Project N°409 IMMUNOTOXKER), and the Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF).

Conference presentation: part of this paper was presented at *ECOBIM meeting*, 2016 May-June, Le Havre, France.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

©Copyright F. Caza et al., 2016
Licensee PAGEPress, Italy
Journal of Xenobiotics 2016; 6:6721
doi:10.4081/xeno.2016.6721

a thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA). The amplified products were analyzed by electrophoresis using 1.5% [w/v] agarose gels, SYBR Safe (Life Technologies) DNA gel staining and UV illumination. Sequencing of the amplicons was performed by the Genome Quebec sequencing platform. Structure figures were prepared in PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System).

Results

Stress-induced ATP-bound hsp70 binds to newly synthesized unfolded or partially folded proteins via interaction with hydrophobic peptide segments and prevents their aggregation into nonfunctional structure. Once the entire protein is synthesized, it binds to nucleotide exchange factors (NEFs), such as BAG, thereby inducing the release of ADP and binding of fresh ATP, opening the binding pocket (reviewed in¹⁷). Hsp70 binds ATP via its N-terminal ATPase domain (NBD), which consists of two lobes with a deep cleft between them, at the bottom of which nucleotide (ATP and ADP)

binds. The substrate binding domain (SBD) of hsp70 is responsible for binding to neutral, hydrophobic amino acid residues in a groove made of subdomains containing sheets and helical segments in a manner that is reminiscent of the MHC peptide binding groove.¹⁸ This groove is closed by an alpha helical-rich C-terminal «lid» that opens and closes to allow for substrate binding and release.

To study hsp70 in *A. ater*, we performed PCR amplification of *hsp70* gene fragments using specific primers designed following analysis of multiple sequence *hsp70* coding sequence alignment with the purpose of PCR amplifying the coding region of hsp70. Following PCR, amplicons were directly sequenced and analyzed using BLASTn and BLASTp hosted by Web servers of the National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). At the DNA level, we found that the sequence of hsp70 of *M. desolationis* was 98% homologous to that of *M. galloprovincialis*, a well-characterized cosmopolitan Mediterranean mussels species. By comparison, the percent homology of *hsp70* sequence from *A. ater* was 81% with *M. galloprovincialis*. The sequence of *hsp70* of *A. ater* was closer to that of *Septifer virgatus*, the black mussel, than that of the blue mussel (Figure 1). At the amino acid level, Hsp70 from *M. desolationis* was very close (99% identity) to that of its closely related species, *M. galloprovincialis* and *M. coruscus* (Table 2). By comparison, the percent of identity between

hsp70 from *M. desolationis* and *hsp70* from *A. ater* and *Septifer virgatus* was 95% and 94% respectively. The major differences at the amino acid level between *hsp70* of *A. ater* and *hsp70* of the blue mussels were located in the N-terminal NBD domain (Figure 2). Most of these differences involved conservative or semi-conservative substitutions, although a number non-conservative substitutions were found, most notably on the external surface of

the SBD, suggesting that *hsp70* from the ribbed mussel *A. ater* differs from the blue mussel in its functional activity (Table 3).

Because of cellular abundance and high degree of conservation, hsp70 is perhaps the best-studied stress biomarker in all taxonomic groups. In the present work, we provide the first molecular characterization of hsp70 in *A. ater*. In contrast to other mussel species, such as *M. edulis* and *M. galloprovincialis*, which

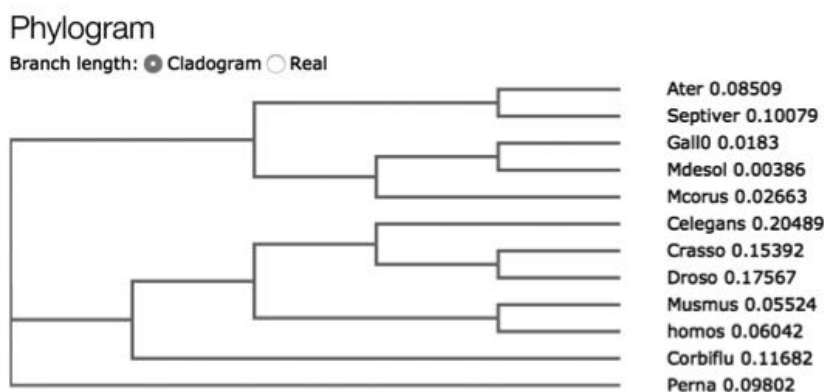


Figure 1. Simplified cladogram showing relationships between mussel species based upon Hsp70 sequence. The cladogram was constructed using the CLUSTAL W (1.83) multiple sequence T-coffee alignment software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>).

Table 1. List of oligoprimers used for amplification of hsp70 of *A. ater* and *M. desolationis*.

Name of primers	Primer sequences	Temperature(°C)	Position	Amplicon Size (bp)
<i>M. desolationis</i>				
Hsp70gallo467F	5'CTGCAGCTGCTATTGCTTATGG3'	62°C	603-625	467
Hsp70gallo467R	5'CATGGACAGCAGCCTTGCT3'		1050-1070	
Hsp70gallo448F	5'AGACAAGGCTGCTGTCCATG3'	62°C	1051-1070	448
Hsp70gallo448R	5'TCAATCTGGGGCACACTC3'		1479-1498	
Hsp70gallo351F	5'CAGAAGGACCGTATCACCGC3'	60°C	1667-1687	351
Hsp70gallo351R	5'GGTTGGTCCACCACCTCCAC3'		1997-2017	
Hsp70gallo487F	5'AGGCAGCCATTTGTCCAGGT3'	60°C	1200-1219	487
Hsp70gallo487R	5'GCGGTGATACGGTCTTCTG3'		1667-1686	
Hsp70gallo829F Hsp70gallo829R	5'CAAGGAAGAAACAAAGCCCAACGAAAC3' 5'CTAAGTCGTCCGACAGCACGC3'	63°C	35-61 843-864	829
<i>A. ater</i>				
Hsp70ater265F	5'ATCACTGCCAAAACTCTCTGGA 3'	61°C	278-299	205
Hsp70ater353R	5'ATGGTTGGTCCACCACCTCC 3'		482-461	
Hsp70ater265F	5'ATCACTGCCAAAACTCTCTGGA 3'	60°C	1686-1708	265
Hsp70ater366R	5'GTCGACCTCTTCAATGTTGGT 3'		1950-1931	
Hsp70ater220bF	5'TCCACAGTAGGAGATGAAAAGC3'	59°C	1681-1703	220
Hsp70ater353R	5'ATGGTTGGTCCACCACCTCC 3'		1950-1931	
Hsp70ater220bFF	5'TCCACAGTAGGAGATGAAAAGC3'	59°C	1667-1686	366
Hsp70ater366R	5'GTCGACCTCTTCAATGTTGGT 3'		2032-2011	
Hsp70ater366F	5'TCAGAAGGACCGTATCACCGC 3'	61°C	1667-1686	353
Hsp70ater353R	5'ATGGTTGGTCCACCACCTCC 3'		2019-2000	

have been studied in details for many years, molecular characterization of *A. ater* genes remains anecdotic at best. Our results showed that hsp70 from *A. ater* is significantly different from that of *M. desolationis*. Such difference can be exploited as a tool to discriminate between *M. desolationis* and *A. ater* samples at the molecular level. The technique is simple to perform and can be implemented in all settings where PCR is available. The molecular characterization of hsp70 in both species thus provides a new tool to better assess in the future the ability of both species to environmental stress. Our recent study did indeed show that both species respond differently to cadmium-induced apoptosis.⁸ Although hsp70 is among the most highly conserved gene during evolution, at the protein level, our results also showed that hsp70 of *A. ater* harbors more than 30 amino acid substitutions when compared to hsp70 of blue mussels. Because the substrate specificity of chaperones like hsp70 is dictated by minor changes in the primary amino acid sequence,¹⁹ these changes may indicate fundamental differences between hsp70 activity in *M. desolationis* and *A. ater*. Whether such differences may alter their ability to respond to environmental stress is an interesting possibility given the progressive disappearance of *A. ater* from many marine habitats.⁷ The development of novel molecular stress biomarkers of *A. ater* could provide a new and complementary tool for monitoring global climate changes in marine ecosystems in the Southern hemispheres, which is particularly sensitive to climate change.

In conclusion, we report the molecular characterization of hsp70 in *A. ater* and highlight major differences at the nucleic acid and protein levels with *M. desolationis*. This information will be useful for the development of new molecular tools to monitor the effect of environmental stress on both mussel populations, which are well known for their ability to co-exist in the same marine habitat. This information will also be useful for learning the phylogenetic relationships between both mussel species and with other *A. ater* populations present in various marine ecosystems in the Southern hemisphere.

Discussion

Because of cellular abundance and high degree of conservation, hsp70 is perhaps the best-studied stress biomarker. In the present work, we provide the first molecular characterization of hsp70 in *A. ater*. In contrast to other mussel species, such as *M. edulis* and *M. galloprovincialis*, which have been studied in details for many years, molecular characterization of *A. ater* genes remains anecdotic at best.

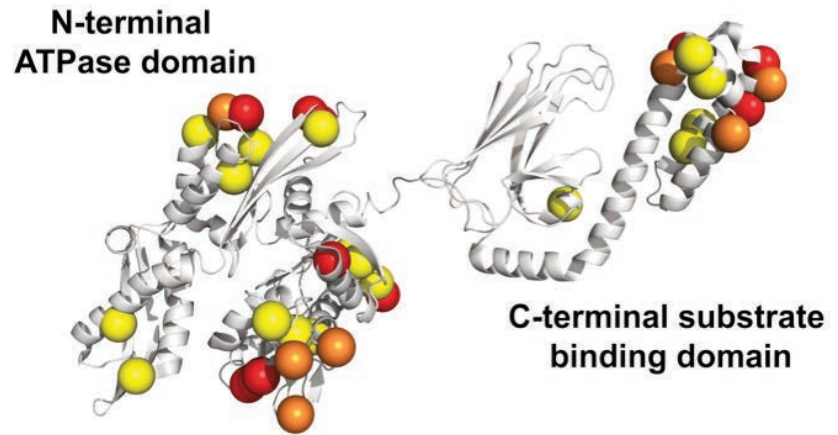


Figure 2. 3D structure of hsp70 from *M. galloprovincialis*. The location of mutated residues from *A. ater* are shown. Yellow and orange spheres represent conservative and semi-conservative substitutions. In red, non-conservative substitutions.

Table 2. Percentages of identity of hsp70 at the amino acid level between species.

Species	<i>M. desolationis</i>	<i>A. ater</i>	<i>M. galloprovincialis</i>
<i>M. desolationis</i>	100%	95%	99%
<i>M. galloprovincialis</i>	99%	95%	100%
<i>M. coruscus</i>	99%	94%	99%
<i>S. virgatus</i>	93%	93%	94%
<i>A. ater</i>	95%	100%	95%
<i>P. viridis</i>	94%	93%	94%
<i>C. fluminae</i>	91%	90%	91%
<i>H. sapiens</i>	90%	88%	90%
<i>M. musculus</i>	90%	88%	90%
<i>C. gigas</i>	91%	90%	91%
<i>C. elegans</i>	68%	67%	70%
<i>D. melanogaster</i>	74%	73%	76%

Table 3. Amino acid substitutions in hsp70 of *M. desolationis* and *A. ater* as compared to hsp70 of *M. galloprovincialis*.

<i>M. galloprovincialis</i> → <i>A. ater</i>	<i>M. galloprovincialis</i> → <i>A. ater</i>	<i>M. galloprovincialis</i> → <i>M. desolationis</i>
Ala ² → Ser ²	Ser ¹⁰⁰ → Thr ¹⁰⁰	
Lys ²¹⁵ → Glu ²¹⁵	Thr ¹⁰⁴ → Ile ¹⁰⁴	
Thr ⁴ → Ser ⁴	Val ¹⁵⁶ → Arg ¹⁵⁶	
Ile ⁸ → Val ⁸	Glu ²⁵⁶ → Asp ²⁵⁶	Thr ¹¹² → Ser ¹¹²
Ala ³²¹ → Ser ³²¹	Gly ²¹⁶ → Glu ²¹⁶	
Val ⁶⁵ → Ser ⁶⁵	Lys ²¹⁶ → Glu ²¹⁶	
Ala ³³⁰ → Gly ³³⁰	Ala ³³¹ → Gln ³³¹	Gln ³⁵⁶ → Asn ³⁵⁶
Asp ⁷⁹ → Glu ⁷⁹		Lys ⁵³² → Gln ⁵³²
Thr ⁹³ → Asp ⁹³	Gln ³⁵⁶ → Asn ³⁵⁶	Ala ⁶³² → Pro ⁶³²
Asn ⁹⁶ → Ser ⁹⁶	Lys ⁴⁵² → Arg ⁴⁵²	
Ser ⁹⁹ → Gly ⁹⁹	Gln ⁵⁵² → Ser ⁵⁵²	
Val ¹⁰⁴ → Ile ¹⁰⁴	Glu ⁵⁵⁵ → Gly ⁵⁵⁵	
Thr ¹¹² → Lys ¹¹²	Glu ⁵⁶⁵ → Ala ⁵⁶⁵	
Ile ¹²⁰ → Val ¹²⁰	Ser ⁵⁶⁶ → Asp ⁵⁶⁶	
Leu ¹³⁹ → Gln ¹³⁹	Glu ⁵⁷¹ → Val ⁵⁷¹	
Val ¹⁴⁰ → Ile ¹⁴⁰	Glu ⁵⁷¹ → Val ⁵⁷¹	
Ser ¹⁴³ → Ala ¹⁴³	Asp ⁵⁷⁷ → Glu ⁵⁷⁷	
Gly ¹⁵⁶ → Arg ¹⁵⁶	Ile ⁵⁷⁹ → Val ⁵⁷⁹	
→ Ser ¹⁹⁰ → Asn ¹⁹¹ → Ala ¹⁹²	Gly ⁶⁰² → Ser ⁶⁰²	

Our results showed that hsp70 from *A. ater* is significantly different from that of *M. desolationis*. Such difference can be exploited as a tool to discriminate between *M. desolationis* and *A. ater* samples at the molecular level. The technique is simple to perform and can be implemented in all settings where PCR is available. Most importantly, the molecular characterization of hsp70 in both species provide a new tool to better assess the ability of both species to environmental stress. Our recent study did indeed show that both species respond differently two cadmium-induced apoptosis⁸. Although hsp70 is among the most highly conserved gene during evolution, at the protein level, our results also showed that hsp70 of *A. ater* harbors more than 30 amino acid substitutions when compared to hsp70 of blue mussels. Because the substrate specificity of chaperones like hsp70 is dictated by minor changes in the primary amino acid sequence¹⁹, these changes may indicate fundamental differences between hsp70 activity in *M. desolationis* and *A. ater*. Whether such differences may alter their ability to respond to environmental stress is an interesting possibility given the progressive disappearance of *A. ater* from many marine habitats⁷. The development of novel molecular stress biomarkers of *A. ater* could provide a new and complementary tool for monitoring global climate changes in marine ecosystems in the Southern hemispheres, which is particularly sensitive to climate change.

Conclusions

In conclusion, we report the molecular characterization of hsp70 in *A. ater* and highlight major differences at the nucleic acid and protein levels with *M. desolationis*. This information will be useful for the development of new molecular tools to monitor the effect of environmental stress on both mussel populations, which are well known for their ability to co-exist in the same marine habitat. This information will also be useful for learning the phylogenetic relationships between both mussel species and with other *A. ater* populations present in various marine ecosystems in the Southern hemisphere.

References

- Goldberg ED. The mussel watch - a first step in global marine monitoring. *Mar Poll Bull* 1975;6:111.
- Robinson CD, Webster L, Martínez-Gómez C, Burgeot T, Gubbins MJ, Thain JE, et al. Assessment of contaminant concentrations in sediments, fish and mussels sampled from the North Atlantic and European regional seas within the ICON project. *Mar Environ Res* 2017;124:21-31.
- Oliva AL, Ovaert J, Arias AH, Souissi S, Marcovecchio JE. Mussels as bioindicators of PAHs pollution within Argentinean Coastal Environments, South America. *Int J Environ Res* 2015;9:1293-304.
- Philipp EE, Kraemer L, Melzner F, Poustka AJ, Thieme S, Findeisen U, et al. Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS One* 2012;7:e33091.
- Poynton HC, Robinson WE, Blalock BJ, Hannigan RE. Correlation of transcriptomic responses and metal bioaccumulation in *Mytilus edulis* L. reveals early indicators of stress. *Aqua Toxicol* 2014;155:129-41.
- Campos A, Apraiz I, da Fonseca RR, Cristobal S. Shotgun analysis of the marine mussel *Mytilus edulis* hemolymph proteome and mapping the innate immunity elements. *Proteomics* 2015;15:4021-9.
- Caza F, Cledon M, St-Pierre Y. Biomonitoring climate change and pollution in marine ecosystems: a review on *Aulacomya ater*. *J Mar Biol* 2016;e2016.
- Caza F, Betoulle S, Auffret M, Brousseau P, Fournier M, St-Pierre Y. Comparative analysis of hemocyte properties from *Mytilus edulis desolationis* and *Aulacomya ater* in the Kerguelen Islands. *Mar Env Res* 2015;110:174-82.
- Lebouvier M, Laparie M, Hulle M, Marais A, Cozic Y, Lalouette L, et al. The significance of the sub-Antarctic Kerguelen Islands for the assessment of the vulnerability of native communities to climate change, alien insect invasions and plant viruses. *Biol Invasions* 2011;13:1195-208.
- Feder ME, Hofmann GE. Heat shock proteins, molecular chaperones and their stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 1999;61:243-82.
- Gross M. Emergency services: a bird's eye perspective on the many different functions of stress proteins. *Curr Protein Pept Sci* 2004;5:213-23.
- Snyder MJ, Girvetz E, Mulder EP. Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 2001;41:22-9.
- Bodin N, Burgeot T, Stanisiere JY, Bocquené G, Menard D, Minier C, et al. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol. Pharmacol* 2004;138:411-27.
- Hamer B, Hamer DP, Müller WE, Batel R. Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study. *Environ Int* 2004;30:873-82.
- Clark MS, Peck LS. HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: a mini-review. *Mar Genomics* 2009;2:11-8.
- Mi ovi V, Bulog A, Ku i N, Jakovac H, Radoševi -Stasi B. Metallothioneins and heat shock proteins 70 in marine mussels as sensors of environmental pollution in Northern Adriatic Sea. *Env Toxicol Pharmacol* 2009;28:439-47.
- Clerico EM, Tilitzky JM, Meng W, Gierasch LM. How hsp70 molecular machines interact with their substrates to mediate diverse physiological functions. *J Mol Biol* 2015;427:1575-88.
- Rippmann F, Taylor WR, Rothbard JB, Green NM. A hypothetical model for the peptide binding domain of hsp70 based on the peptide binding domain of HLA. *EMBO J* 1991;10:1053-9.
- Mack KL, Shorter J. Engineering and evolution of molecular chaperones and protein disaggregases with enhanced activity. *Front Mol Biosci* 2016;e3.