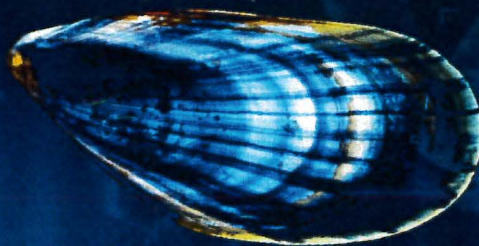
The background of the slide is a dark blue field filled with glowing, semi-transparent DNA double helix structures and various chemical structures, including nucleotides and sugar rings. The DNA strands are rendered in a light blue color, creating a sense of depth and scientific complexity.

# EFFETS DU CADMIUM SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE DE LA MOULE



UN MODÈLE *IN VITRO* ET UNE  
APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE

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

**Les effets du cadmium sur le système immunitaire de la moule bleue,  
*Mytilus edulis* : un modèle *in vitro* et une approche transcriptomique**

Par

**Philippine Granger Joly de Boissel**

Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
*Philosophiae doctor* (Ph.D)  
en Biologie

**Jury d'évaluation**

Président du jury et examinateur interne : David Chatenet (Ph.D)  
Groupe de Recherche en Ingénierie de Peptides et en Pharmacothérapie  
INRS – Institut Armand Frappier

Examineur externe : Maikal Rosabal (Ph.D)  
Département des Sciences Biologiques  
Université du Québec à Montréal

Examineur externe : Isabel Desgagné-Penix (Ph.D)  
Département de Chimie, Biochimie et Physique  
Université du Québec à Trois-Rivières

Codirecteur de recherche : Ahmed Siah (Ph.D)  
BC Centre for Aquatic Health Sciences

Remis le 14 août 2018

© Droits réservés de Philippine Granger Joly de Boissel, 2018



À Dieu

À mes grands-parents paternels et à ma grand-mère maternelle

À ma famille :

à Lolo les grosses cuisses

à mon poussin,

à ma Camiluky

à mon Bat aplastado

à la Gallada del Ostional (los amo)

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé, à titre professionnel ou personnel, à la réalisation de ma thèse doctorale.

Tout d'abord un grand merci à mes différents directeurs sans qui ce projet n'aurait jamais existé.

Thank you Dr. Frederick Kibenge (AVC - UPEI - PEI), for your patience, your advices, your suggestions and for the place you gave to me in your labs (3XX S)! Thank you for the confidence you had on me and for the virology knowledges you share with me during my stay at UPEI.

Merci au Dr. Michel Fournier (INRS-Armand Frappier – Laval - QC), qui malgré la distance et les nombreux problèmes de santé qui ont dû être une adversité pour lui, m'a permis de faire partie du projet IPOC et de réaliser mon doctorat.

Un grand merci au Dr. Ahmed Siah (BC Centre for Aquatic Health Sciences - Vancouver - BC) qui aussi malgré la distance a réussi à m'aiguiller. Grace à vous j'ai appris ce qu'est la bio-informatique et les programmes qui existent pour analyser les mega-database. Bon...au fond je vous ai maudit car ce n'était pas une partie de plaisir...mais je vous pardonne car c'était super enrichissant et intéressant !

Je remercie aussi le Dr. Yves St-Pierre (INRS-Armand Frappier – Laval, QC) et le Dr. Jérôme Cachot (Université de Bordeaux – EPOC – Bordeaux) car ils ont été tous d'abord des personnes de confiance à qui j'ai pu confier mes angoisses et mes craintes. Ils m'ont aussi accueilli dans leurs laboratoires respectifs (hors cadre de mon projet de recherche) et mon fait une place dans leur équipe. Merci pour les heures d'écoutes, pour les conseils, la bonne ambiance et le réconfort que j'ai pu trouver dans vos équipes.

Dr. Jérôme Cachot, vous avez su me faire aimer la science et la recherche, vous avez laissé une empreinte positive et d'admiration dans mon cœur. Vous n'êtes pas seulement un chercheur que j'apprécie mais vous êtes principalement une personnalité que j'admire par votre humanité, votre écoute et le temps que vous donnez aux gens qui vous entoure. Merci encore pour l'accueil dans votre laboratoire.



Si je devais remercier toutes les personnes qui ont participé à mon évolution personnelle et professionnelle pendant ma formation scientifique (et qui ont permis à ce document scientifique d'exister), je devrais rajouter un chapitre à mon manuscrit et je devrais utiliser des qualificatifs anglo-franco-hispanophone incompréhensibles. Vous vous imaginez le mix... non, non... De toute façon même les mots ne sont pas suffisants... alors je les porte dans mon cœur et je vous laisse admirer leurs portraits !

### Les profs et les « petites fées du labo »



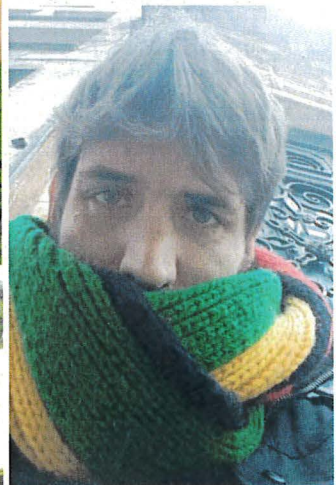
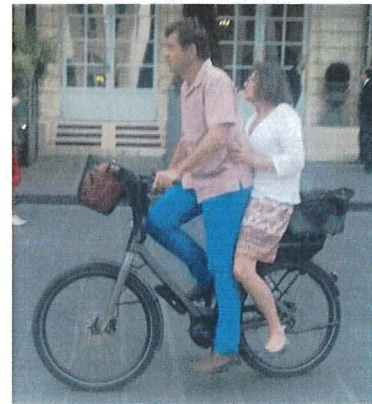
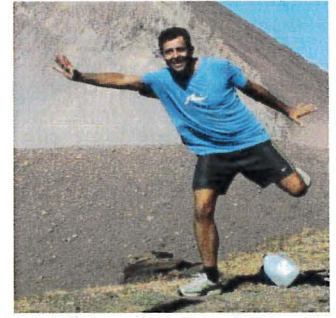
La « maman »

### Mes « piliers » scientifiques et mes « pote-o(x) » de la vie





Mes coup de ♥





## RÉSUMÉ EN FRANCAIS

Le cadmium (Cd) est un métal divalent non essentiel connu comme étant toxique pour les organismes. On le retrouve dans tous les écosystèmes et sur le globe terrestre à des concentrations plus ou moins importantes en raison de l'érosion des sols, des incendies de forêt, mais plus encore dû au secteur de l'industrie et aux activités minières. Les principaux réceptacles de la contamination au Cd sont les écosystèmes aquatiques. Dans ces écosystèmes, les bivalves sont exposés à la contamination de leur environnement. Ces organismes sont sédentaires, filtres d'eau et accumulateurs de métaux ; ils ne peuvent donc pas échapper aux pressions dû aux activités humaines (ou pressions anthropiques). Pour ces raisons, les bivalves, plus particulièrement les moules, sont considérés comme des bioindicateurs et donc utilisés comme organismes modèles pour caractériser la contamination de leurs écosystèmes. Ils sont constamment exposés aux changements abiotiques (pH, CO<sub>2</sub>, température, etc.) et biotiques (bactéries, virus, toxines, etc.). Afin de se protéger, leur première barrière de défense est leur système immunitaire inné (ils n'ont pas de système immunitaire adaptatif), l'hémolymphe, composée de cellules hémocytaires (hemocytes) et de composant humoraux. La principale fonction des hémocytes est de phagocyter des corps étrangers comme des agents pathogènes ou des particules. Les composants humoraux sont responsables de reconnaître et de détruire les corps étrangers. Parce que les moules sont sous pression anthropique et leur principale défense est leur système immunitaire inné, nous avons émis l'hypothèse que le cadmium pouvait affecter l'expression de gènes liés à l'immunité plus spécifiquement aux processus de phagocytose. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons mise en place un modèle mécanistique, Nous avons développé un modèle *in vitro* dans lequel nous avons exposé les hémocytes de moules à une gamme de concentration de cadmium (de 10<sup>-9</sup>M à 10<sup>-3</sup>M) pour mesurer l'activité phagocytaire et la viabilité cellulaire. Nous avons ensuite séquencé le transcriptome (RNA-seq) des hémocytes non exposés et des hémocytes exposés à 10<sup>-3</sup>M Cd pour réaliser une analyse des mécanismes induits et une analyse différentielle de l'expression des gènes (DGE).

Ensuite nous avons sélectionné des gènes qui pourraient caractériser la toxicité au cadmium et finalement nous avons validé l'expression génique de potentiels marqueurs en utilisant une approche RT-qPCR. Nous avons également corrélé l'expression des gènes avec les paramètres fonctionnels (phagocytose et viabilité cellulaire).

Les résultats obtenus ont montré que les moules exposées à  $10^{-3}$ M de Cd ont présenté plus de mortalité cellulaire et une forte diminution de leur activité phagocytaire (directement liée à la présence de cadmium et non pas causée par la mortalité cellulaire mesurée). L'analyse RNA-seq a permis de reconstruire un transcriptome *de novo* contenant 189422 contigs (séquence génomique provenant des analyses post-séquençage) et l'annotation a permis de caractériser 23,2% du transcriptome. Le DGE a montré que 1028 transcrits étaient surexprimés en présence de Cd et 84 étaient sous-exprimés. À partir de 1112 transcrits, vingt-deux gènes ont été sélectionnés comme des biomarqueurs potentiels. Nous avons ciblé un transcrit impliqué dans les voies de calcium (Calmoduline), quatre senseurs pathogènes (TLR et RIG-1), trois gènes impliqués dans la mobilité cellulaire (Actin, TPS5 et NAS13) et trois dans l'apoptose et les dommages à l'ADN. Pour valider notre modèle nous avons également étudié cinq gènes impliqués dans la cytotoxicité du Cd (SOD, MRP1, CYP2C8, GST et HSP70). De tous les gènes présélectionnés, nous avons validé l'expression de douze gènes *via* une retro-transcription suivit d'une amplification en chaîne par polymérase semi-quantitative en temps réelle (RT-qPCR). Les résultats ont montré que les deux technologies utilisées pour l'expression génique sont comparables (DGE vs RT-qPCR). Cette étude est la première qui identifie les effets du cadmium sur des transcrits impliqués dans l'immunité des bivalves. L'induction des TLRs, RIG-1, NAS13 et XIAP n'avait pas été étudié après une exposition au cadmium, cependant ils ont un rôle essentiel dans la phagocytose et la défense cellulaire. Par ailleurs, l'analyse du transcriptome, en générale, a révélé que le cadmium induit aussi des gènes impliqués dans les processus apoptotiques.

Finalement, dans notre étude nous proposons douze nouveaux marqueurs qui caractérisent la toxicité du Cd dans les hémocytes de moules.

Mots clés : cadmium ; moule bleue ; système immunitaire ; hémocytes ; transcriptomique ; expression génique ; RNA-seq ; biomarqueurs ; *in vitro*



## ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a non-essential divalent metal known to be toxic for organisms. It can be found in all of the world at different concentrations due to the soil erosion, forest fire, but more over because of industry and mining activities. The main receptacles of Cd contamination are aquatic ecosystems. In these ecosystems, bivalves, filter-feeders' organisms are exposed to the contamination of their surroundings. They are sedentary, accumulator of metals and they cannot escape to the anthropic pressures. For these reasons, bivalves, more specifically mussels, are considered as bioindicators and they are used as model organisms to characterize the contamination of their ecosystems. Also, they are exposed to abiotic (pH, CO<sub>2</sub>, temperature, etc.) and biotics (bacteria, virus, toxins, etc) changes. Their first defense is the hemolymph, open vascular innate immune system, which is composed by hemocytes and humoral components (they lack of adaptive immune defense). The main function of hemocytes is to phagocyte foreign bodies as pathogens or particles. The humoral components are responsible to recognize and destroy foreign bodies. Because mussels are under anthropic pressures and their main defense is their innate immune-system, we have hypothesized that cadmium may affect the expression of immune-related genes involved into phagocytosis processes of mussels's hemocytes. To develop our hypothesis, we have 1) developed an *in vitro* model exposing mussels' hemocytes to different concentration of cadmium (from 10<sup>-9</sup>M to 10<sup>-3</sup>M) to measure phagocytosis activity; 2) sequenced the transcriptome (RNA-seq analysis) of non-exposed hemocytes and 10<sup>-3</sup>M-exposed hemocytes to compare gene expression (DGE analysis) and select potential genes that could characterize cadmium toxicity and 3) validate the gene expression of selected genes using a RT-qPCR approach. We have also correlated gene expression with functional parameters (phagocytosis and cell viability). The results obtained have shown that mussels exposed to 10<sup>-3</sup>M of Cd presented more cell mortality and a strong decrease in their phagocytic activity. The RNA-seq analysis has permitted to rebuild a *de novo* transcriptome containing 189422 *contigs* and the annotation has allowed to characterize 23.2% of the transcriptome.

The DGE as shown that 1028 transcripts were over expressed in presence of Cd and 84 under-expressed. From 1112, twenty-two genes were selected has potential biomarkers including one in calcium pathways (Calmodulin), four pathogens sensors (TLRs and RIG-1), three genes involved in cell mobility (Actin, TPS5 and NAS13) and three in apoptosis and DNA damages, we also studied five genes involved in Cd cytotoxicity (SOD, MRP1, CYP2C8, GST and HSP70) to validate our model.

Of all the pre-selected genes, we validated the expression of twelve genes *via* RT-qPCR. The results showed that the two technologies used for gene expression are comparable (DGE vs RT-qPCR). This study is the first to identify the effects of cadmium on transcripts involved in bivalve immunity. Induction of TLRs, RIG-1, NAS13 and XIAP had not been studied after exposure to cadmium, however they have an essential role in phagocytosis and cell defense. In addition, transcriptome analysis, in general, revealed that cadmium also induces genes involved in apoptotic processes.

Finally, in our study we propose twelve new markers that characterize the toxicity of Cd in the hemocytes of mussels.

Keywords: cadmium; blue mussel; transcriptome; gene expression; RNA-seq; biomarkers; *in vitro*



# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iv
RÉSUMÉ EN FRANCAIS.....	vii
ABSTRACT .....	ix
TABLE DES MATIÈRES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xv
TABLE DES ESPÈCES .....	xx
FIGURES .....	xxi
TABLES.....	xxiii
ANNEXES.....	xxiv
CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE .....	xxv
PROBLÉMATIQUE.....	xxvi

## CHAPITRE I : SYNTHÈSE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIF ..... 1

<b>1 SYNTHÈSE .....</b>	<b>2</b>
1.1 La moule bleue, <i>Mytilus edulis</i> , un modèle biologique .....	2
1.1.1 Distribution et environnement de la moule.....	2
1.1.2 Production de <i>M. edulis</i> .....	4
1.1.3 Reproduction et cycle de vie .....	5
1.1.4 Anatomie.....	6
1.2 Le système immunitaire des bivalves.....	9
1.2.1 Les cellules immunitaires .....	9
1.2.2 Les médiateurs humoraux.....	14
1.2.3 Les facteurs de transcription .....	24
1.2.4 Le système complémentaire, l'apoptose et l'autophagie.....	25
1.3 Le cadmium.....	29
1.3.1 Description du cadmium et de son utilisation.....	29
1.3.2 Comportement et toxicité du cadmium .....	30
1.3.3 Teneur du cadmium dans les écosystèmes aquatiques .....	34
1.3.4 Le cadmium et le système immunitaire des bivalves .....	38
1.4 La transcriptomique ou séquençage de l'ARN (RNA-seq).....	39
1.4.1 L'histoire du séquençage .....	39
1.4.2 Les trois générations de séquençage.....	41
1.4.3 La chimie du séquençage : le modèle d'Illumina .....	42
1.4.4 Le séquençage et les analyses bio-informatiques .....	44
1.4.5 La transcriptomique pour l'étude des bivalves.....	46
<b>2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS .....</b>	<b>49</b>
<b>3 RÉFÉRENCES .....</b>	<b>50</b>

## CHAPITRE II : TESTS PRÉLIMINAIRES POUR LA MISE EN PLACE DES TESTS *IN VITRO*

.....	66
<b>1 IDENTIFICATION DE L'ESPÈCE UTILISÉE</b> .....	<b>67</b>
<b>2 INFLUENCE DU SEXE DES MOULES SUR LA PHAGOCYTOSE</b> .....	<b>68</b>
2.1 Résumé en français.....	69
2.2 Rapport.....	70
2.2.1 Introduction.....	71
2.2.2 Materiel and methods.....	72
2.2.3 Results and discussion.....	74
2.2.4 Conclusion.....	78
<b>3 RÉFÉRENCES</b> .....	<b>79</b>

## CHAPITRE III : RÉPONSES FONCTIONNELLES ET MOLÉCULAIRES DES HÉMOCYTES DE *M. EDULIS* EXPOSÉS AU CADMIUM : UN MODÈLE *IN VITRO* ET UNE APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE (PUBLICATION #1). ....

.....	82
<b>1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS</b> .....	<b>84</b>
<b>2 ARTICLE</b> .....	<b>85</b>
2.1 Introduction.....	87
2.2 Materials and methods.....	88
2.2.1 Mussels collection and hemocytes extraction.....	88
2.2.2 Determination of cell viability.....	88
2.2.3 <i>In vitro</i> hemocytes exposure.....	89
2.2.4 Cell viability, phagocytic activity and RNA samples.....	89
2.2.5 RNA extraction, cDNA library preparation and RNA-Seq by illumina sequencing..	90
2.2.6 RNA-seq analysis.....	90
2.2.7 Statistical analysis.....	91
2.3 Results and discussion.....	92
2.3.1 Viability and phagocytic activity after Cd exposure.....	92
2.3.2 Sequence statistics.....	92
2.3.3 Overview of <i>M. edulis</i> transcriptome.....	94
2.3.4 Differential gene expression analysis.....	97
2.3.5 Phagocytosis-related genes and biomarkers.....	99
2.4 Conclusion.....	104
2.5 References.....	105

**CHAPITRE IV : IDENTIFICATION ET VALIDATION DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES  
MODULÉS PAR LE CADMIUM (PUBLICATION # 2)..... 115**

<b>1</b>	<b>RÉSUMÉ EN FRANÇAIS .....</b>	<b>117</b>
<b>2</b>	<b>ARTICLE .....</b>	<b>118</b>
2.1	Introduction.....	120
2.2	Materials and methodology.....	121
2.2.1	In vitro test, transcriptome assembly, annotation and differential gene expression (DGE) 121	
2.2.2	Real-time reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) analysis.....	122
2.2.3	Differential Gene Expression (DGE) analysis and rt-qPCR. ....	123
2.2.4	Statistical analysis.....	123
2.3	Results .....	125
2.3.1	DGE annotation and selection of target transcripts.....	125
2.3.2	RT-qPCR analysis and comparison with DGE analysis .....	126
2.3.3	Principal component analysis (PCA) .....	129
2.4	Discussion .....	132
2.5	References .....	136
2.6	Supplementary data.....	145

**CHAPITRE V : DISCUSSION GÉNÉRALE..... 148**

<b>1</b>	<b>LES EFFETS DU CADMIUM SUR LES FONCTIONS HÉMOCYTAIRES : MISE EN PLACE D'UN MODÈLE <i>IN VITRO</i>. .....</b>	<b>150</b>
<b>2</b>	<b>LES EFFETS DU CADMIUM AU NIVEAU MOLÉCULAIRE SUR LES PROCESSUS PHAGOCYTAIRES ET IMMUNITAIRES .....</b>	<b>153</b>
2.1	La migration des hémocytes .....	153
2.2	La reconnaissance des pathogènes.....	156
2.3	Les voies de signalisation cellulaires .....	158
2.3.1	La voie NF- $\kappa$ B .....	158
2.3.2	La voie des IRFs .....	159
2.3.3	La voie MAPK .....	159
2.4	Les effecteurs immunitaires .....	160
2.4.1	Peptides antimicrobiens (AMPs) .....	160
2.4.2	Le système proPo .....	160
2.4.3	Cytokines et leurs récepteurs .....	161
2.4.4	La voie de JAK/STAT .....	162
<b>3</b>	<b>LA PHAGOCYTOSE ET LE LYSOSOME .....</b>	<b>162</b>
<b>4</b>	<b>LE SYSTÈME COMPLÉMENTAIRE .....</b>	<b>163</b>
<b>5</b>	<b>LE STRESS OXYDANT, LES MRP ET LES HSP .....</b>	<b>164</b>
<b>6</b>	<b>LA GÉNOTOXICITÉ, L'APOPTOSE ET L'AUTOPHAGIE .....</b>	<b>165</b>
<b>7</b>	<b>CORRÉLATION ENTRE LES FONCTIONS HÉMOCYTAIRES ET LES MARQUEURS MOLÉCULAIRES .....</b>	<b>167</b>



<b>CHAPITRE V : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>168</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>172</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>181</b>

## ABBREVIATIONS

<b>‰</b>	Salinité pour mil
<b>Act</b>	Actine
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>ADNcp</b>	ADN complémentaire primaire
<b>ADNcs</b>	ADN complémentaire secondaire
<b>ADN/DNA</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AP1</b>	Facteur activateur de protéine 1
<b>ARN/RNA</b>	Acide ribonucléique
<b>ATG</b>	Autophagy related genes
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate
<b>Bf</b>	Facteur B
<b>C1q</b>	Complément 1
<b>C3</b>	Complément 3
<b>Ca</b>	Calcium
<b>CALM</b>	Calmoduline
<b>CAS8</b>	Caspase 8
<b>CAT</b>	Catalase
<b>Cd</b>	Cadmium
<b>CDC42</b>	Cell division control protein 42 homolog
<b>CNV</b>	Variation du nombre de copies
<b>COMP/THBS5/TPS</b>	Oligomeric matrix protein / thrombospondines
<b>CRD</b>	Domaine de reconnaissance des carbohydrates
<b>CREB</b>	C-AMP response element-binding protein
<b>CRT</b>	Cycle de terminaison réversible
<b>CTLs</b>	Lectines de type C
<b>Cu</b>	Cuivre
<b>CYP2C8</b>	Cytochrome P450 2C8
<b>Cyt-c</b>	Cytochrome c
<b>DCE</b>	Directives cadre sur l'eau
<b>ddNTP</b>	Didésoxyribonucléotide
<b>DGE</b>	Differential gene expression / expression différentielle des gènes
<b>DIABLO/SMAC</b>	Second mitochondria-derived activator of caspases

<b>dNTP</b>	Désoxyribonucléotide
<b>DRAC3</b>	Dell remote access controller 3
<b>ECM</b>	Matrice extracellulaire
<b>EcSOD</b>	Extracellular superoxide dismutase
<b>emPCR</b>	PCR en émulsion
<b>EPA</b>	Agence américaine de Protection de l'Environnement
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinases
<b>EST</b>	Expressed sequences tag
<b>FADD</b>	Fas-associated protein with death domain
<b>g</b>	Grammes
<b>GADD45</b>	Growth arrest and DNA damage
<b>GNBP</b>	Gram-negative bacteria-binding protein
<b>GO</b>	Gene ontology
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydase
<b>GR</b>	Glutathion réductase
<b>GSH</b>	Glutathion-s réduite
<b>GST</b>	Glutathion-s-transférase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hydroperoxyde d'hydrogène
<b>HAP</b>	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
<b>HCM</b>	Hoffman modulation contrast microscopy
<b>HOCl</b>	Acide hypochloreux
<b>HPF</b>	Heures post-fécondation
<b>HSP</b>	Heat shock protein
<b>IAP</b>	Inhibitor of apoptosis protein
<b>IFN</b>	Interférons
<b>IKK/NEMO</b>	NF-κB essential modulator
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IMCV</b>	IPS-1/MAVS/CARDIF/VISTA
<b>IMD-like</b>	Immune Deficiency-like
<b>IPOC</b>	Interactions entre la Pollution et les Changements climatiques
<b>IPS-1/MAVS/CARDIF/VISTA</b>	Virus-induced signaling adapte
<b>IRF</b>	Interferon regulatory factor
<b>JAK/STAT</b>	Janus kinases/transducteurs de signal et activateurs de transcription
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinases



<b>jpf</b>	Jours post-fécondation
<b>Kb</b>	Kilo base
<b>KEGG</b>	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
<b>Kg</b>	Kilogrammes
<b>L</b>	Litres
<b>LBP</b>	Lipopolysaccharides binding protein
<b>LC3/ATG8</b>	Autophagy related genes 8
<b>LGBP</b>	Protéines de liaison aux lipopolysaccharide- $\beta$ -1,3-glucan
<b>LGP2</b>	Laboratory of genetics and physiology 2
<b>LITAF</b>	TNF- $\alpha$ LPS-induit
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides
<b>LRR</b>	Domaine de répétition de leucine extracellulaire / leucine-rich-repeat domain
<b>LTA</b>	Acides lipoteichoïque
<b>MAL/TIRAP</b>	MyD88 adapter-like
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinases
<b>MDA5</b>	Melanoma differentiation associated factor gene 5'
<b>MIF</b>	Facteurs d'inhibition de migration des macrophages
<b>mL</b>	Millilitres
<b>MMPS</b>	Métalloprotéinase matricielle
<b>MP</b>	Métalloprotéases
<b>MPO</b>	Myéloperoxydase
<b>MRP1</b>	Protéine multi-résistante 1
<b>mTOR</b>	Mechanistic target of rapamycin
<b>MYD88</b>	Myeloid differentiation primary response gene 88
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
<b>NEMO/IKK</b>	NF- $\kappa$ B Essential Modulator
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>ng/L</b>	nanogramme par litre
<b>NGS</b>	Next generation sequencing
<b>nM</b>	Nano molaire
<b>NO</b>	Oxyde nitrique
<b>NOD-like/NLR</b>	Nucléotide oligomerization domain receptors
<b>°</b>	Degré Celsius
<b>O<sup>1</sup><sub>2</sub></b>	Oxygène singulet

<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène moléculaire
<b>OH<sup>·</sup></b>	Radicaux hydroxyles
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la Santé
<b>ONOO<sup>·</sup></b>	Ion peroxy-nitrite
<b>PAM/AMP</b>	Peptide antimicrobiaux
<b>PAMPS</b>	Motifs moléculaires associés aux pathogènes / pathogen-associated molecular pattern
<b>pb</b>	Paire de base
<b>PCA</b>	Principal component analysis
<b>PCB</b>	Polychlorobiphényl
<b>PCR</b>	Réaction de polymérase en chaîne
<b>PGN</b>	Peptidoglycane
<b>PGRP</b>	Peptidoglycane recognition protéine
<b>PI/IP</b>	Iodure de propidium
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PO</b>	Phénoloxylase
<b>PPi</b>	Pyrophosphate
<b>proPO</b>	Pro-phénoloxylase
<b>PRR</b>	Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
<b>qPCR</b>	PCR quantitative
<b>RCBA</b>	Réseau canadien de biosurveillance aquatique
<b>RIG-1</b>	Retinoic acid-inducible gene-1
<b>RLR</b>	Retinoic acid-inducible 1-like
<b>RNA-seq</b>	Séquençage de l'acide ribonucléique
<b>RNS</b>	Substances réactives de l'azote / Reactive Nitrogen Species
<b>ROS</b>	Substances réactives de l'oxygène / Reactive Oxygen Species
<b>RPKM</b>	Reads per kilobase per million
<b>RT-PCR</b>	Retro-transcription PCR
<b>SMAC/DIABLO</b>	Second mitochondria-derived activator of caspases
<b>SNPS</b>	Polymorphismes de nucléotide simple
<b>SOCS</b>	Suppresseurs de la voie de signalisation des cytokines
<b>SOD</b>	Super oxyde dismutase
<b>SRA</b>	Short read archive
<b>SRCR</b>	Scavenger receptor cysteine-rich protein domain
<b>SR<sub>s</sub></b>	Scavenger receptor

<b>TBK1</b>	Serine/threonine-protein kinase
<b>TIMP</b>	Metallopeptidase inhibitor
<b>TIR</b>	Récepteur Toll/ interleukine-1 / Toll/interleukin-receptor
<b>TIRF</b>	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
<b>TLR</b>	Recepteur Toll-like
<b>TNF</b>	Facteurs de nécrose tumorales
<b>TRAF3</b>	TNF receptor-associated factor 3
<b>TRAM</b>	Translocation Associated Membrane Protein
<b>VCL</b>	Vitellin coat lysin
<b>VERL</b>	Vitellin envelop receptor lysin
<b>XIAP</b>	X-linked inhibitor of apoptosis protein
<b>Zn</b>	Zinc
<b><math>\mu</math>M</b>	Micro-molaire



## TABLE DES ESPÈCES

Nom entier	Abréviations	Nom courant
<i>Anguilla japonica</i>		Anguille du japon
<i>Bathymodiolus azoricus</i>		Modiole profonde des Açores
<i>Chlamys farreri</i>	<i>C. farreri</i>	Coquille chinoise
<i>Chlamys islandican</i>		Pétoncle du Canada
<i>Chlamys opercularis</i>		Pétoncle blanc
<i>Corbicula fluminea</i>	<i>C. fluminea</i>	Corbicule asiatique
<i>Crassostrea angulata</i>		Huître portugaise
<i>Crassostrea gigas</i>	<i>C. gigas</i>	Huitre creuse
<i>Crassostrea virginica</i>	<i>C. virginica</i>	Huitre américaine
<i>Crenomytilus grayanus</i>		Moule
<i>Haliotis discus discus</i>	<i>H. discus</i>	Disk abalone
<i>Haliotis diversicolor</i>		Abalone colorée
<i>Haliotis tuberculata</i>		Ormeau
<i>Litopenaeus vannamei</i>		Crevette à pattes blanches
<i>Mercenaria mercenaria</i>		Quahaug
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	<i>M. yessoensis</i>	Pétoncle japonais
<i>Morone saxatilis</i>		Bar rayé
<i>Mya arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>	Mye commune
<i>Mytilus californianus</i>	<i>M. californianus</i>	Moule californienne
<i>Mytilus coruscus</i>	<i>M. coruscus</i>	Moule coréenne
<i>Mytilus edulis</i>	<i>M. edulis</i>	Moule bleue
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	Moule méditerranéenne
<i>Mytilus trossulus</i>	<i>M. trossulus</i>	Foolish mussel ou Bay mussel
<i>Ostrea edulis</i>	<i>O. edulis</i>	Huitre plate
<i>Patinopecten yessoensis</i>		Pétoncle géant
<i>Pecten maximus</i>	<i>P. maximus</i>	Coquille St-Jacques
<i>Pinctada fucata</i>	<i>P. fucata</i>	Huitre perlière
<i>Pinctada martensii</i>		Huitre perlière Akoya
<i>Procambarus clarkii</i>		Écrevisse de Louisiane
<i>Ruditapes decussatus</i>	<i>R. decussatus</i>	Palourde commune
<i>Ruditapes philippinarum</i>	<i>R. philippinarum</i> /	Palourde
<i>Venerupis philippinarum</i>	<i>T. philippinarum</i>	
<i>Saccostrea glomerata</i>	<i>S. glomerata</i>	Huitre de roche (Sydney rock oyster)
<i>Scylla serrata</i>		Crabe des palétuviers
<i>Sinonovacula constricta</i>		Chinese razor clam
<i>Sparus aurata</i>		Dorade royale
<i>Tachypleus tridentatus</i>		Limule de Chine
<i>Venerupis decussatus</i>		Palourde commune

# FIGURES

## Chapitre I

Figure 1 : Photo de <i>M. edulis</i> . A) Coque de la moule fermée ; B) <i>M. edulis</i> semi-ouverte. Aperçu du muscle adducteur (en blanc) ; C) <i>M. edulis</i> complètement ouverte .....	2
Figure 2 : A) Répartition de <i>Mytilus edulis</i> sur le globe terrestre. B) Interaction entre les différentes sous-espèces de <i>Mytilus</i> spp.....	3
Figure 3: Production mondiale (en tonnes) de <i>M. edulis</i> .....	4
Figure 4 : Principaux éléments anatomiques internes de la moule bleue .....	6
Figure 5 : Processus de phagocytose par une cellule phagocytaire .....	13
Figure 6 : Liste des différents effecteurs immunitaires retrouvés chez bivalves.....	19
Figure 7 : A) Apoptose cellulaire. B) Autophagie cellulaire.....	27
Figure 8 : Interactions entre les différents composants immunitaires des bivalves.....	28
Figure 9 : Répartition des espèces chimique du cadmium dans une solution en fonction de la salinité à pH 8.....	31
Figure 10 : Les effets toxiques du Cd d'un point de vue cellulaire .....	32
Figure 11 : Concentrations de cadmium mesurées dans différents bivalves en Asie, Europe et Amérique.....	37
Figure 12 : Étapes de la chimie de séquençage de Illumina.....	43
Figure 13 : Différentes applications des NGS en fonction de la molécule cible .....	44
Figure 14 : Processus des analyses bio-informatiques.....	46

## Chapitre II

Figure 15 : Amplicon de PCR spécifique pour le marker Glu 5' pour <i>M. edulis</i> .....	68
Figure 1: Immunological response of hemocytes exposed to cadmium in relation to the sex A) Percentage of viable cells; B) Percentage of phagocytosis activity for female (F) and male (M) .....	75
Figure 2 : Microscopically visualization (20X - Axio Cam HRC) of stained gonads from <i>M. edulis</i> and rt-PCR product ethidium-bromide staining bands visualization on 1% agarose gel.....	76



### Chapitre III

Figure 1 : Percentage of viability and phagocytosis of <i>M. edulis</i> hemocytes exposed to different concentrations of Cd ranging from 0 to $10^{-9}$ M. ....	93
Figure 2 : Functional annotation of assembled sequences based on gene ontology (GO) categorization. ....	95
Figure 3: Phagosome pathways (ko04145).....	96
Figure 4: DGE analysis. A. Sample distribution based on Euclidean distance. B. Volcano plot of transcripts based on the Log <sub>2</sub> FC and FDR with symbol of the most significantly expressed genes and regulated genes studied here. C. Heatmap of the 1112 expressed genes extracted from the volcano plot.....	98
Figure 5: Gene expression in log <sub>2</sub> (RPKM) of A-Housekeeping genes, B-Immuno-related transcripts, C- ECM / Cytoskeletal-related transcripts and D- Stress responses-related transcripts.....	99

### Chapitre VI

Figure 1: Gene Ontology (GO-Slimmer) hit percentage.....	126
Figure 2: A) Gene expression levels (Log <sub>2</sub> FC) obtained by DGE and RT-qPCR ; B) Pearson's correlation of gene expression obtained by DGE (DGE) and RT-qPCR (qPCR). ....	128
Figure 3: A. Individuals and B. Variables map of the principal component analysis (PCA) using gene expression obtained by RTqPCR and cell parameters .....	130
Figure 4: Pearson's correlations of gene expression obtained by qPCR and cell parameters .....	131

#### Supplementary data

S1: Equation to calculate the efficiency and the log <sub>2</sub> FC (gene expression) .....	145
S2: Housekeeping genes expression.....	145
S3: Contribution of vector in the PCA analysis.....	146
S4: Toll-like receptor pathways induced by cadmium in <i>M. edulis</i> hemocytes.....	147

# TABLES

## Chapitre I, II et V

Tableau 1 : Classification des cellules hémocytaires.....	11
Tableau 2 : Principaux senseurs de pathogènes associés à leurs localisations et leurs ligands. ....	15
Tableau 3 : Classification des métaux en fonction de leurs affinités pour les ligands riches en oxygène, azote et soufre. ....	30
Tableau 4 : Concentration (ng/L et nM) de Cd dissous dans la phase liquide (eau) dans différents écosystèmes aquatiques.....	36
Tableau 5 : Propriétés principales des différentes plateformes de séquençage.....	41
Tableau 6 : Cycle de PCR utilisé pour la validation de l'espèce utilisée.....	67
Tableau 7 : Effets in vitro du Cd sur les hémocytes provenant de différents bivalves .....	151

## Chapitre II

Tableau 1: Sex of mussels determined by histology, bands intensity of VCL and VERL PCR products obtain in Fig. 1A' and 1B' and final sex assignment based on RT-PCR results. ....	77
---	----

## Chapitre III

Tableau 1: The descriptive statistics of the <i>M. edulis</i> hemocytes transcriptome.....	93
--	----

## Chapitre IV

Tableau 1: List of primers, annealing temperatures (°C) and RTqPCR efficiency (%).....	124
--	-----

## ANNEXES

ANNEXE I: Phylogénie de <i>M. edulis</i> .....	181
ANNEXE II: Modèle de l'Ion Libre (FIAM) et du Ligand Biotique (BLM) .....	182
ANNEXE III: Chimie de séquençage de 454 Sequencing (Roche).....	183
ANNEXE IV: Chimie de séquençage de la plateforme SOLiD (Life Technology) .....	184
ANNEXE V: Courbe dose-réponse de la viabilité cellulaire et de la phagocytose des hémocytes de <i>M. edulis</i> exposé <i>in vitro</i> au cadmium.....	186
ANNEXE VI: Cinétique des effets des milieux de culture cellulaires sur les fonctions phagocytaires des hémocytes de <i>Mye arenaria</i> .....	187
ANNEXE VII: Régulation de l'actine du cytosquelette .....	188
ANNEXE VIII: Voie de la phagocytose médiée PAR Fc gamma R.....	189
ANNEXE IX: Voie de signalisation des TLR.....	190
ANNEXE X: Voie de signalisation NF-kB .....	191
ANNEXE XI: Voie de signalisation JAK/STAT.....	192
ANNEXE XII: Lysosome .....	193
ANNEXE XIII: Apoptose.....	194
ANNEXE XIV: Autophagy animal .....	195



## CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE

Le programme de recherche « Interactions entre la Pollution et les Changements climatiques: développement d'une nouvelle stratégie de surveillance » (IPOC) propose de développer une stratégie de surveillance pour évaluer les effets de la pollution, en combinaison avec les changements climatiques, grâce à l'utilisation des bivalves marins et d'eau douce, lesquels sont considérés comme des organismes sentinelles.

Ce programme cherche à relier les réponses biologiques à des réponses génétiques (au niveau de la population et au niveau individuel) et aussi à des marqueurs physiologiques (pour caractériser l'état de santé des populations). Pour cela, le projet est composé de plusieurs volets: 1) évaluer les impacts sur la physiologie, 2) identifier des cibles cellulaires et moléculaires (biomarqueurs traditionnels), 3) évaluer les mécanismes moléculaires cellulaires en utilisant des approches génomiques et transcriptomiques.

IPOC s'inscrit dans le thème de recherche « Amélioration des Services des Écosystèmes Aquatiques » dans le domaine de « Sciences et Technologies de l'Environnement ». Il entre également dans le cadre de la « Compréhension des Changements dans l'Arctique et de l'Environnement de la Région Froide » du nouveau programme du CRSNG impliqué dans « Les changements climatiques et la Recherche Atmosphérique » et par conséquent dans le « Groupe international des organismes de financement pour la Recherche des Changements Globaux ».

L'étude présentée ici fait partie du troisième volet du programme IPOC : identifier des mécanismes moléculaires cellulaires via l'étude du transcriptome. Ce projet de doctorat ne fait mention que des résultats obtenus pour une espèce spécifique soumise à un métal dont les effets ont été mesurés via des tests *in vitro* et à l'aide d'une approche transcriptomique. Ces résultats devraient être reliés aux différents volets de recherche proposés par IPOC afin de révéler leur puissance, leur poids, leur intérêt et leur importance dans un contexte de biosurveillance. Dans mon document, leur interprétation reste donc à un niveau « indépendant / isolé ».

# PROBLÉMATIQUE

Les activités humaines sont responsables de l'introduction de multiples substances d'origines industrielles, domestiques, urbaines ou agricoles dans l'environnement (Ettajani and Amiard, 1995). Les principaux réceptacles de tous types de contamination sont les écosystèmes aquatiques. En effet, les produits déversés sur les écosystèmes terrestres, comme les pesticides, sont lessivés et érodés par les pluies et les vents et terminent dans les milieux aquatiques. Les polluants atmosphériques, quant à eux, sont dissous ou emportés dans les gouttes d'eau et finissent dans les écosystèmes terrestres et/ou dans les écosystèmes aquatiques. Plusieurs de ces polluants ont une forte capacité d'adsorption à la phase particulaire et peuvent donc être retrouvés en concentrations importantes dans le compartiment sédimentaire des fleuves, estuaires ou zones côtières. D'autres sont hydrophiles et se retrouvent dans la phase aqueuse des systèmes aquatiques. Cependant, tous ces polluants représentent une menace pour les organismes ainsi que pour leurs écosystèmes.

Néanmoins, depuis quelques décennies il existe une prise de conscience de cette contamination. Actuellement, en Europe (les Directives Cadre sur l'eau, DCE) mais aussi au Canada (Réseau canadien de biosurveillance aquatique (RCBA)), la qualité des eaux est devenue primordiale non seulement pour son utilisation au sein de la population mais aussi pour la préservation de la flore et de la faune. Dans ce contexte, des réseaux de biosurveillance ont vu le jour.

La biosurveillance est l'étude de la quantification et de la mesure des effets des polluants dans les tissus d'un organisme. Cette notion fait appel aux bio-indicateurs et aux biomarqueurs (Aarab, 2004) :

- ✓ Les biomarqueurs sont définis comme : « des changements observables et/ou mesurables au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, révélant l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant » (Kaviraj et al., 2014).

On distingue de manière générale : i) les biomarqueurs d'exposition: ils donnent des informations sur la nature et l'intensité des toxiques biodisponibles dans le milieu. Ils sont impliqués dans différents systèmes de métabolisation et détoxification des xénobiotiques ou dans les mécanismes de défense. Leurs présences n'entraînent pas obligatoirement des effets délétères irréversibles et mortels. ii) les biomarqueurs d'effets: ils correspondent à des cibles moléculaires. Lorsqu'elles sont atteintes, cela signifie que les mécanismes de défense ou de détoxification sont surpassés.

Les conséquences peuvent être parfois irréversibles, pouvant entraîner la mort de l'animal ou bien une incapacité à se reproduire, se développer, etc.

De tels effets peuvent par la suite altérer la structure même des populations. Ils rendent compte de la gravité des atteintes fonctionnelles des organismes et permettent de prédire des effets sur les communautés, les populations et les écosystèmes (Aarab, 2004; Zuykov et al., 2013)

- ✓ Les organismes bio-indicateurs sont : « des organismes qui par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques ou écologiques, permettent de façon pratique et sûre de caractériser l'état d'un écosystème » (Blandin, 1986). Il existe plusieurs espèces indicatrices, mais étant donné l'impossibilité d'un suivi biologique sur toutes celles-ci, un certain nombre d'espèces ont été sélectionnées pour fournir un indice valable de l'étendue de la contamination et des dommages induits par les polluants. Elles doivent remplir un certain nombre de caractéristiques: être plus ou moins tolérantes aux polluants, sédentaires, abondantes, à durée de vie longue, de tailles suffisantes pour permettre des analyses, faciles à échantillonner et à conserver. Ces mêmes caractéristiques font de ces organismes d'excellentes espèces sentinelles (organisme spécifiquement placé dans un écosystème pour informer sur la pollution environnementale)

Les écosystèmes aquatiques, étant les réceptacles finaux des apports en polluants, ont été les premiers à servir pour la mise en place des études de biosurveillance (Bessi and ElAlami, 2009). Il a été mis en avant que les mollusques sont de bons indicateurs de la pollution aquatique car ils sont sédentaires et sont soumis aux pressions anthropiques. Par ailleurs, ils ont une forte capacité d'accumulation des produits chimiques, plus particulièrement des métaux, et sont cependant tolérants aux variations physico-chimiques du milieu. Les connaissances existantes sur les mollusques et leur physiologie sont donc un atout primordial pour le développement de techniques permettant d'évaluer la qualité des habitats aquatiques. Les deux espèces marines les plus communément utilisées lors de ces études sont l'huître, *Crassostrea gigas* (*C. gigas*), et la moule, *Mytilus spp.* En effet, ces deux espèces ont été et sont utilisées afin d'évaluer la toxicité de polluants tels que les métaux (Beiras and Albentosa, 2004; Mai et al., 2012), les médicaments (Di Poi et al., 2014), les pesticides (Beiras and Albentosa, 2004; Mai et al., 2012), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Geffard et al., 2004, 2002) ou encore pour évaluer la qualité chimique des eaux ou des sédiments pollués. Par ailleurs, *Mytilus spp.* a été utilisée comme sentinelle dans le programme *Mussel Watch*, un des premiers programmes de suivi écotoxicologique mis en place en 1965 (Kimbrough et al., 2008).



Chez les bivalves, parmi les grandes fonctions physiologiques, le système immunitaire constitue un mécanisme d'intérêt majeur. En effet, leur système immunitaire est leur premier système de défense face aux infections.

Une altération de ces fonctions peut engendrer des effets sur la survie de l'organisme et peut mener jusqu'à la mort des individus (Fournier et al., 2000). Chez les bivalves, le système est composé de cellules immunitaires (les hémocytes) et les médiateurs humoraux. Ensemble ils sont responsables de plusieurs fonctions physiologiques ainsi que du maintien homéostatique (Callaway et al., 2012). Le système immunitaire nous a paru être le meilleur système pour décrire l'état de santé de ces organismes.

Face à l'augmentation de la contamination, il est impératif de développer des outils pour évaluer et caractériser les effets des contaminants. Avec l'apparition de nouvelles technologies, telles que le séquençage à haut débit et la transcriptomique l'étude des effets des polluants sur les mécanismes cellulaires est en croissance. Ces technologies nous offrent une compréhension mécanistique plus approfondies et permettent de comprendre les effets sur des voies de signalisation moléculaires jusqu'à maintenant peu étudiées et peu comprises. Elles permettent d'identifier de nouveaux gènes/protéines, et de nouvelles interactions géniques qui pourraient faire partie des réseaux d'étude toxicologique. Elles sont aussi une source pour créer des outils écotoxicologiques plus précis, comme par exemple des marqueurs moléculaires plus sensibles et plus précis.

Dans ce contexte, l'objectif des travaux présentés dans ce manuscrit est de développer une étude mécanistique des effets du cadmium sur les fonctions hémocytaires de *Mytilus edulis*. Le manuscrit est divisé en cinq chapitres. Le **premier chapitre**, Synthèse, Hypothèse et Objectifs, replace le lecteur dans le contexte de l'étude. Ce chapitre permet d'établir les bases et les connaissances sur le sujet étudié. Il présente l'hypothèse de l'étude et les objectifs qui ont été mis en place pour vérifier l'hypothèse. Le **deuxième chapitre** est consacré aux tests préliminaires et est présenté sous un rapport rédigé en anglais. Le **troisième chapitre** cible les réponses fonctionnelles des hémocytes. Il est constitué d'un article scientifique publié. Le **quatrième chapitre** présente la validation des premiers résultats obtenus. Il est rédigé sous un format d'article soumis et en cours de correction. Le **cinquième chapitre** présente une discussion globale des résultats obtenus tout le long du projet. Il est plus orienté sur des résultats non présentés dans les articles scientifiques. Le dernier et **sixième chapitre** du document présente les conclusions et les perspectives.

## **CHAPITRE I**

### **SYNTHÈSE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS**

---

# 1 SYNTHÈSE

## 1.1 La moule bleue, *Mytilus edulis*, un modèle biologique

Le modèle biologique choisi est la moule bleue ou moule commune (Figure 1), connu sous le nom scientifique de *Mytilus edulis* (*M. edulis*) (Linnaeus 1758). Elle fait partie du règne animal. C'est un organisme du clade des bilatéraux et qui se trouve dans le sous-clade de lophotrochozoans puis des bivalves (Annexe I). D'un point de vue systématique, la moule fait partie de la famille des *Mytilinae* et du genre *Mytilus*.

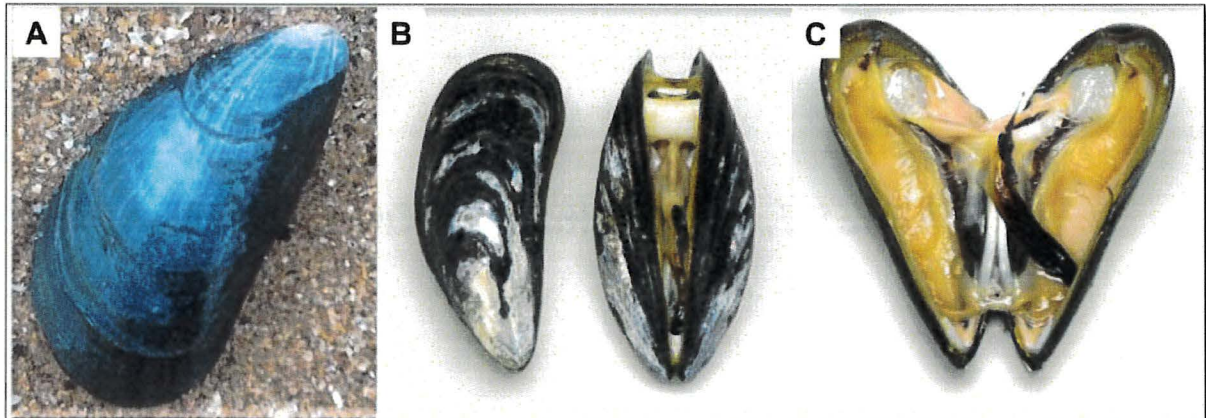


Figure 1 : Photo de *M. edulis*. A) Coque de la moule fermée ; B) *M. edulis* semi-ouverte. Aperçu du muscle adducteur (en blanc) ; C) *M. edulis* complètement ouverte. Distinction des deux valves symétriques ainsi que des organes internes (NatureWatch NZ, 2016).

### 1.1.1 Distribution et environnement de la moule

*M. edulis* présente une grande distribution (Figure 2-A) principalement grâce à sa capacité à supporter de larges fluctuations de salinité (euryhaline), dessiccation (élimination/retrait de l'eau), température (eurytherme) et oxygène. Étant euryhaline, elle peut vivre aussi bien dans les eaux marines (à 31‰ de salinité) que dans les eaux saumâtres possédant une salinité aussi très basse (4‰). Néanmoins, elle ne se développe pas dans des eaux ayant une salinité inférieure à 15‰ et son taux de croissance est réduit en dessous de 18‰ (FAO, 2004). Elle s'acclimata bien à une gamme de température variant entre 5 et 20°C et peut aussi supporter des conditions glaciales pendant plusieurs mois (Delahaut, 2012).



Comme nous pouvons le voir dans la figure 2-A, *M. edulis* peut-être retrouvée aussi bien au Canada, dans le pôle sud (zones glaciales telles que l'archipel des Kerguelen), en Europe ou encore en Asie (climat plus doux).

Étant hautement tolérante à un large éventail de conditions environnementales, *M. edulis* peut aussi se développer, vivre ou cohabiter avec d'autres espèces dans de nombreux habitats (Figure 2-B). *M. edulis* cohabite avec *Mytilus trossulus* (*M. trossulus*) dans le Nord-Est de l'Amérique et *Mytilus galloprovincialis* (*M. galloprovincialis*), *M. trossulus* et *Mytilus californianus* (*M. californianus*) dans Nord-Ouest. En Europe elle cohabite avec *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*, et *M. californianus*. Sa dispersion sur le globe terrestre est due aux courants océaniques qui transportent des larves de façon horizontale et verticale. Cette cohabitation a des avantages d'un point de vue écologique mais pour des aspects d'études écotoxicologiques, elle représente parfois un inconvénient. Par exemple, au Canada, *M. trossulus* et *M. edulis* vivent dans la même zone et elles ne sont physiquement pas différenciables, ce qui pour des fins scientifiques implique une étape d'identification (souvent réalisée par identification génétique) pour valider l'espèce étudiée.

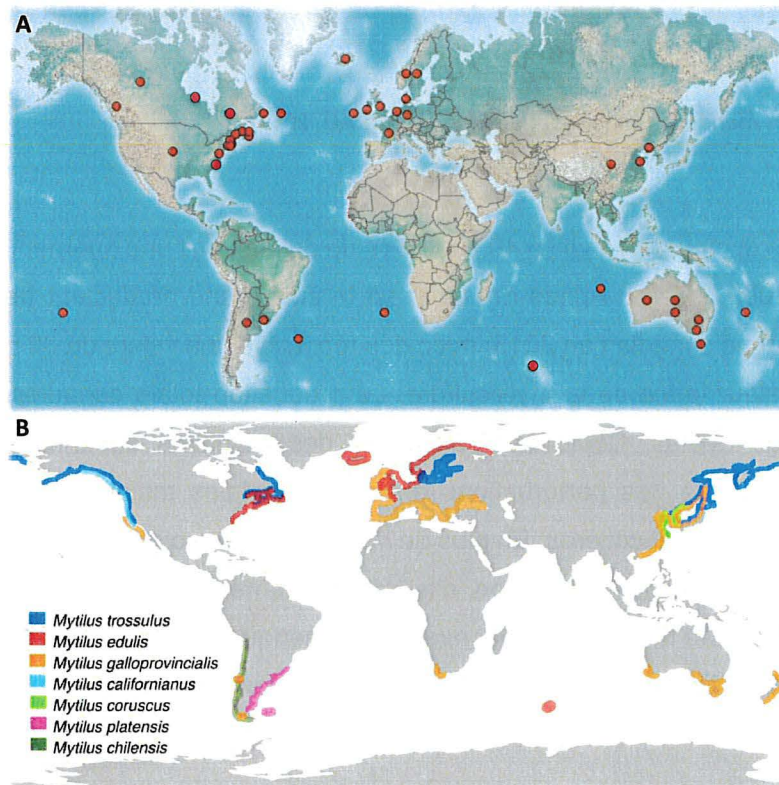


Figure 2 : A) Répartition de *Mytilus edulis* sur le globe terrestre. B) Interaction entre les différentes sous-espèces de *Mytilus spp* (adaptée de Gaitán-Espitia et al., 2016 et Roberts, 2018).

### 1.1.2 Production de *M. edulis*

*M. edulis* (ainsi que les autres espèces) a été pêchée pendant des siècles sur des gisements coquilliers naturels dans la plupart des pays européens. Elle a servi comme appâts pour les poissons avant d'être consommée par les humains. Le marché international des moules a augmenté d'une manière consistante au cours des 20 dernières années comme nous pouvons le constater dans la figure 3.

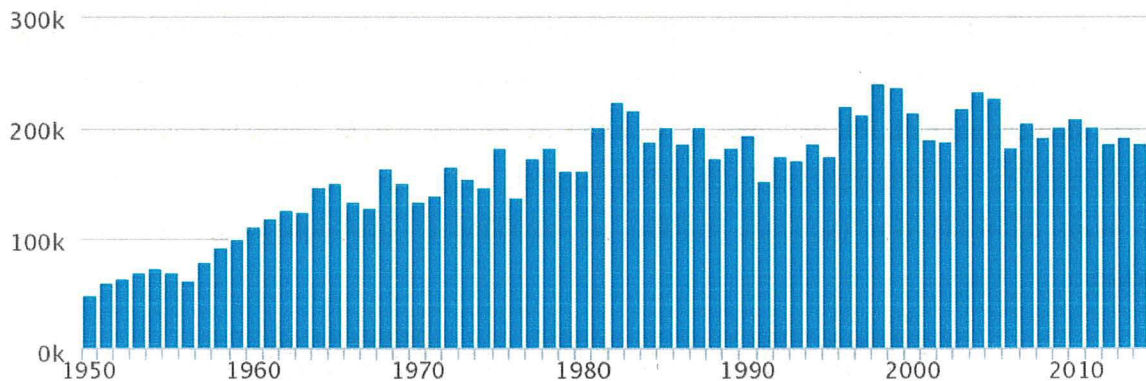


Figure 3: Production mondiale (en tonnes) de *M. edulis* (FAO, 2017)

En 2013, la vente de moule s'élevait à 49,5 millions de dollars, soit une augmentation de sa valeur de 68% depuis 2009. L'Île-du-Prince-Édouard est le plus grand producteur de moules du pays (avec 79% du marché canadien en 2013) avec des récoltes d'une valeur de 30 millions de dollars, soit 61% de la valeur totale de la mytiliculture. La production totale canadienne représente un volume de 29 100 tonnes. Cependant, au cours des dernières décennies, la forte activité anthropique a engendré des perturbations environnementales majeures qui ont affectées la qualité des eaux marines et côtières. En plus de la prédation des oiseaux et de la détérioration de la qualité de l'eau causée par la pollution, d'autres problèmes peuvent limiter le développement de la mytiliculture dans le futur comme par exemple le manque de moules juvéniles ou la présence de toxines qui entraîneraient une fermeture des parcs ostréicoles.

Afin de mieux comprendre ces problématiques, au Canada, des études scientifiques sont mises en place. Elles portent notamment sur l'élevage de la moule bleue (optimisation de la collecte des naissains de moule, renforcement de la capacité des moules à rester sur les filières pendant la récolte, atténuation et contrôle des espèces envahissantes, etc.) mais aussi sur l'utilisation des nouvelles technologies pour améliorer sa production, tout en assurant un développement durable de l'industrie (Gouvernement du Canada, 2015). La sédentarité, la production et la consommation de la moule ainsi que sa dispersion et sa résistance aux fluctuations climatiques et océaniques attirent beaucoup les scientifiques.

### 1.1.3 Reproduction et cycle de vie

La moule est un organisme qui possède deux stades de vie : le stade sédentaire (ou fixé) et le stade planctonique (ou larvaire). Le stade dépend du niveau de développement de l'organisme. Le stade planctonique commence dès la fécondation, lorsque les moules expulsent leurs gamètes dans l'eau. Les oocytes sont fertilisés par le sperme, puis après 4-5 heures post fécondation (hpf), la première division cellulaire se met en place et il en résulte une larve mobile appelée « trochophore » (Sud and CRC Bretagne Sud, 2010). Cette dernière peut se déplacer grâce à son cil apical. Au bout de 1-3 jours post fécondation (jpf), les larves prennent une forme similaire à un « D » et le cil apical disparaît pour laisser place au velum, un organe locomoteur. Ce stade est connu comme le stade larvaire « D – véligère ». Au bout de 10-12 jpf, la larve passe au stade véligère et perd toute forme spécifique. Puis 20 à 25 jpf, il y a apparition d'un « œil » noir et du pied ce qui correspond au stade pédivéligère. A la fin de ce stade, la larve est prête à se fixer. Elles cherchent un substrat solide et se métamorphosent en post-larve (ou naissain). La larve passe ainsi d'un stade planctonique à un stade de vie sédentaire où elle sera potentiellement utilisée pour la production et la consommation humaine (Aucoin et al., n.d.; Helm and Bourne, 2006).



### 1.1.4 Anatomie

La moule bleue est un organisme à corps mou entouré et protégé par une coquille triangulaire allongée faite de carbonate de calcium qui mesure entre 7 à 10 cm (Fig. 1-A/B). Cette coquille est composée de deux valves symétriques (Fig. 1-C) qui sont contrôlées par des ligaments situés le long de la charnière dorsale lesquels sont reliés aux muscles adducteurs antérieur et postérieur (Fig. 1-B et C ainsi que Fig. 4-a) (FAO, 2017). Ces muscles sont la seule partie anatomique qui relie le corps mou de la moule à sa coquille. La coquille est recouverte d'une fine couche protectrice appelée périostracum. L'intérieur, quant à lui, est fait de nacre.

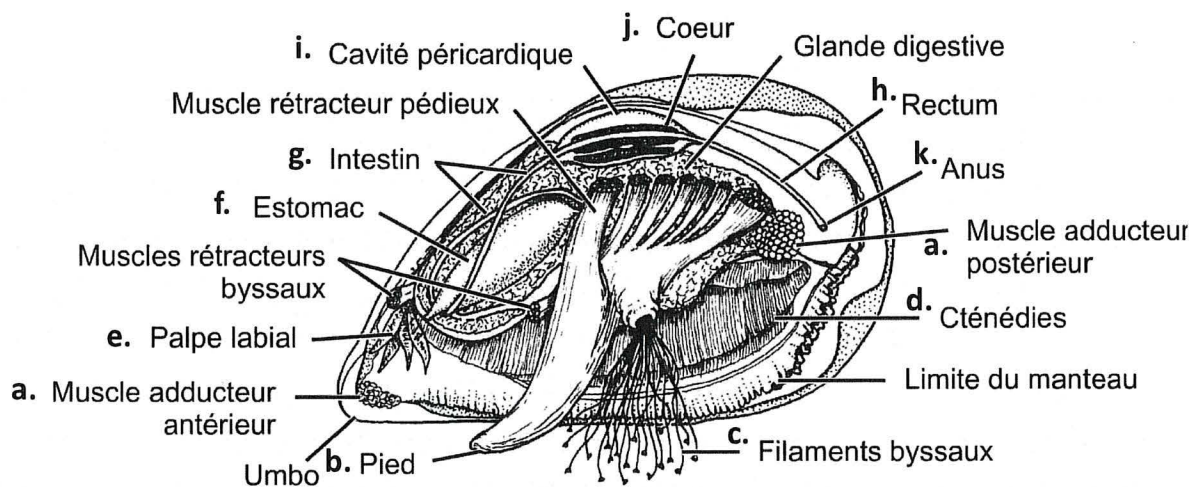


Figure 4 : Principaux éléments anatomiques internes de la moule bleue (BIODIDAC)

Le corps de la moule est composé d'un manteau (non identifié sur la Fig. 4) qui recouvre l'intérieure de la coquille et la masse viscérale dorsale. Au niveau du pied, un sillon sécrète des filaments adhésifs très solides et souples : le byssus (Fig. 4-c). Les filaments bysiaux sont composés d'un mélange de protéines et de glucides, parfaitement inaltérable. Ceux-ci permettent à la moule de s'attacher aux substrats durs ou les unes aux autres et de résister aux courants ou aux vagues. Le manteau, quant à lui, sert de réserve énergétique et assure la réparation et la synthèse de la coquille de la moule. Les bords du manteau forment, à l'arrière du corps mou, des siphons inhalant et exhalant. Les siphons sont responsables de faire rentrer et sortir l'eau dans les valves (Fisheries and Oceans, 2003). Les branchies, situées contre le manteau, sont la clé de la régulation de la respiration et de l'alimentation de la moule. Elles sont faites de filaments remplis de cils. L'alimentation se fait *via* le siphon inhalant. L'eau brassée/nettoyée est expulsée grâce au siphon excréteur (Delahaut, 2012; Fisheries and Oceans, 2003).

La nourriture est transférée des branchies à la bouche grâce aux palpes labiaux (Fig. 4-e). On retrouve ces palpes labiaux ainsi que la bouche entre les lobes du manteau. La bouche se poursuit par un œsophage très court arrivant à un estomac (Fig. 4-f) globuleux pourvu d'un cæcum de stylet postérieur long, dans lequel se trouve une tige cristalline (le stylet) qui tourne sur elle-même (Delahaut, 2012). Cette tige a pour rôle de dissocier les aliments et de faire la digestion enzymatique. La dissociation permet d'envoyer les petites particules vers les glandes digestives tandis que les particules de plus grandes tailles sont envoyées dans l'intestin (Fig. 4-g). Ce dernier est sinueux et est suivi du rectum (Fig. 4-h). Finalement les déchets sont expulsés sous forme solide par le siphon exhalant *via* l'anus (Fig. 4-k).

La moule est un organisme qui ne possède pas de cerveau et son système nerveux est constitué d'un réseau de nerfs et de paires de ganglions cérébro-pleuraux, pédaux et viscéraux. Les ganglions cérébraux, situés de chaque côté de l'œsophage, contrôlent les organes sensoriels tandis que les ganglions pleuraux sont reliés aux nerfs de la cavité du manteau. Les ganglions pédaux, qui contrôlent le pied, sont situés à sa base, et les ganglions viscéraux, qui peuvent être assez importants chez les bivalves, sont situés sous le muscle adducteur postérieur. Les gonades se développent sous la cavité péricardique (Fig. 4-i) et s'étendent sur presque tous les autres organes sauf sur les branchies, les muscles adducteurs et le pied. La papille génitale se trouve proche de la cavité du manteau et du muscle adducteur postérieur. Les spermatozoïdes et ovocytes sont transportés des gonades vers la papille génitale puis sont expulsés soit par les gonoductes ou soit par les reins (MESA, 2015). Les gonades sont responsables de la maturation et production des gamètes et ainsi assurent la survie et la reproduction de la moule.

Le cœur repose dans la cavité péricardique (Fig. 4-i et 4-j). Celui-ci possède un ventricule et deux oreillettes. Comme tous les bivalves, la moule bleue possède un système sanguin ouvert hémolympatique. La circulation se fait à partir du ventricule qui pousse l'hémolymphe dans les aortes vers les artères puis dans les artérioles et aboutit dans des lacunes où l'hémolymphe circule sans être endigué, baignant ainsi les tissus (Delahaut, 2012). Au niveau des branchies, l'hémolymphe se charge d'oxygène et est ensuite pompée par le cœur afin d'être répartie dans tous les tissus de l'organisme (Morin, 2002). Comme pour la plupart des autres mollusques, les organes excréteurs des bivalves sont une paire de reins qui débouche dans la cavité juste au-dessous du cœur, et d'une vessie qui stocke l'urine. Les déchets métaboliques sont évacués par la vessie où ils rejoignent le courant d'eau exhalant (Oceans 2003; Delahaut 2012).

**Leur système sanguin ouvert est l'unique défense immunitaire que possède ces organismes.** En effet, l'hémolymphe se retrouve dans tous les tissus et a pour rôle de défendre les moules contre d'éventuels infections bactériennes, virales, ou encore de réparer les plaies. Il se compose de cellules mais aussi de médiateurs humoraux.



## 1.2 Le système immunitaire des bivalves

Tous les animaux sont confrontés à un grand nombre de microorganismes (bactéries, champignons, parasites protozoaires, virus) qui peuvent affecter leur santé et leur survie. Afin de combattre et de se protéger les organismes vivants possèdent un système de défense : le système immunitaire. Il existe deux types de système immunitaire : le système inné, présent chez tous les organismes, et le système adaptatif, qui n'a été identifié que chez les vertébrés. Chez les bivalves, le système immunitaire est inné et est composé de cellules immunitaires; les hémocytes; et de molécules biologiquement actives connues sous le nom de médiateurs humoraux (macromolécules présentes dans les fluides intra et extracellulaires) (Ellis et al., 2011). Les hémocytes et les médiateurs humoraux travaillent en équipe et jouent un rôle primordial pour le bon fonctionnement de la défense de l'organisme.

### 1.2.1 Les cellules immunitaires

L'hémolymphe est comparable au sang et il y véhicule des cellules connues sous le nom d'hémocytes. Ces dernières sont capables d'encapsuler, de phagocyter et de détruire les microorganismes.

#### 1.2.1.1 Le type de cellule hémocytaire et son origine

Phagocyter : détruire par phagocytose

Phagocytose : capacité de certaines cellules à « englober » un organisme vivant (pathogénique ou non), une molécule (inorganique ou organique), ou encore des cellules modifiées de l'organisme lui-même (Stuart and Ezekowitz, 2005)

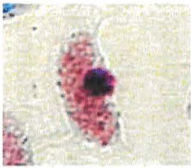
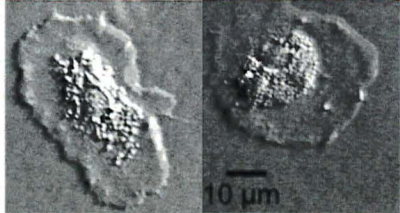
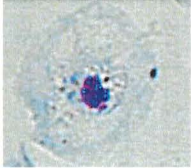
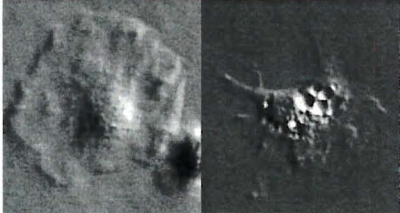
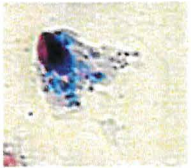
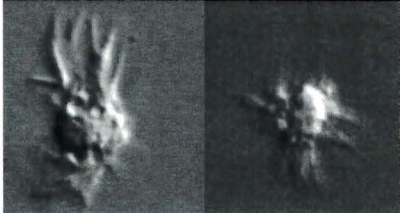
Les cellules hémocytaires peuvent être catégorisées en fonction de leurs caractéristiques morphologiques, fonctionnelles et immunologiques. Bien que la classification des hémocytes des mollusques fasse encore débat, deux types cellulaires semblent dominants : les granulocytes et les hyalinocytes (agranulocytes). Elles se caractérisent par la présence ou l'absence de granules (élément ou vacuole ayant une allure sphérique pouvant contenir toutes sortes de molécules et ayant différentes fonctions) (Cheng, 1984; Hégaret et al., 2003; Soudant et al., 2013).

Foll et ses collaborateurs ont classifié les hémocytes en fonction de leur composition interne *via* une coloration à l'« *Hemacolor* » (Le Foll et al., 2010) (Tableau 1). Les granulocytes éosinophiles, cellules colorées en rouge, sont retrouvés de façon abondante (35-65%) dans l'hémolymphe. Leur taille est d'environ 10  $\mu$ M et de nombreux vacuoles (correspondant probablement à des phagosomes) sont observables. Leur capacité de phagocytose est élevée (Le Foll et al., 2010).

Les granulocytes basophiles sont les cellules les moins abondantes, leur cytoplasme présente une coloration bleue-violette. Les basophiles ont tendance à s'agglomérer et ont un rôle important dans l'interaction entre hémocytes. Leur catégorisation est extrêmement difficile à cause de la présence des granules. Les granulocytes éliminent les agents pathogènes ou les molécules étrangères par phagocytose, dégradations oxydatives ou enzymatiques.

Les hyalinocytes se divisent en lymphocytes (non présents chez les bivalves) et monocytes. Ils sont non granuleux, avec une coloration violette, et d'une taille similaire à celle des granulocytes. Ils n'ont pas ou presque pas de capacité phagocytaire. C'est une population cellulaire hétérogène et elle semble être impliquée dans la production de la matrice extracellulaire pour la « réparation » des plaies (Cajaraville et al., 1996; Ellis et al., 2011; Mateo, 2010).

Tableau 1 : Classification des cellules hémocytaires (Le Foll et al., 2010)

Types de cellules	Abondance (%)	Taille cellulaire <sup>a</sup>	Granules <sup>b</sup>	Fonctions	Capacités phagocytaires <sup>c</sup>	Coloration Hemacolor	Apparence HMC <sup>d</sup>
Granulocytes Eosinophiles	35-65	10	Granules acides Phagosome	Phagocytose	Élevée		
Hyalinocytes	5-45	10	Pas de granules Phagosome	Réparation des plaies	Faible		
Granulocytes Basophiles	20-25	7	Semi-granules basiques	Interaction entre les hémocytes	Nulle		

<sup>a</sup> La taille est égale au diamètre basé sur le signal électrique du volume de cellule en suspension dans l'hémolymphe analysé par cytométrie de flux ; <sup>b</sup> Granules : la description se base sur les granules intracellulaires après coloration à l'Hemacolor ; <sup>c</sup> Capacité phagocytaire : capacité à phagocyter, trois ou plus, les microsphères fluorescentes de 2µm. <sup>d</sup> HMC= Hoffman modulation contrast microscopy (en français : Modulation de contraste de Hoffman), une technique de microscopie



Tandis que la caractérisation des hémocytes reste encore l'objet d'un débat, leur origine elle reste extrêmement mal connue. Les cellules hémocytaires ne se multiplient pas, ce qui suggère l'existence d'un ou de plusieurs sites d'hématopoïèse. Matozzo et ses collaborateurs ont trouvé que des hémocytes récemment formés provenaient de la division de cellules souches chez *Ruditapes philippinarum* (*R. philippinarum*) (Matozzo et al., 2008). D'un point de vue cellulaire, Elston et Leibovitz ont décrit la présence de cellules phagocytaires dans la cavité viscérale des larves de *Crassostrea virginica* (*C. virginica*) ainsi que dans le velum des larves de *C. virginica* et *C. gigas* (Elston and Leibovitz, 1980). Balseiro et ses collaborateurs ont mis en évidence une activité phagocytaire à 24 hpf chez *M. galloprovincialis* tandis que Song et ses collaborateurs ont observé une activité similaire mais à 17 hpf dans le velum des larves D-preveligere (Balseiro et al., 2011; Song et al., 2016). Ces études mettent en avant la présence d'hémocytes fonctionnels très tôt dans le développement des larves de bivalves. Grâce aux nouvelles technologies moléculaires, des marqueurs hémocytaires ont été identifiés au niveau du stade gastrula et trochophore indiquant la présence de ces cellules tôt dans le développement larvaire (Tirapé et al., 2007). De leur côté, Xing et ses collaborateurs ont mis en évidence des facteurs régulateurs de l'hématopoïèse et du développement hémocytaire chez les larves D-véligère de *Chalmys farreri* dans les organes digestifs (Xing et al., 2014). À ce jour, on considère donc que le développement et la formation des hémocytes s'effectueraient dans les stades larvaires précoces au niveau du système digestif ou dans les cellules mésothéliales associées au système digestif (Dyachuk, 2016; Tirapé et al., 2007)

Hématopoïèse : processus physiologique de production des cellules sanguines ou bien éléments figurés du sang

Cellules souches : cellules indifférenciées capable, à la fois, de générer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire et de se maintenir dans l'organisme par prolifération

Cellules somatiques : toutes les cellules d'un organisme sauf les cellules germinales (cellule responsable de la formation des gamètes)

Marqueurs hémocytaire : gène exprimé spécifiquement par les hémocytes.

### 1.2.1.2 La phagocytose

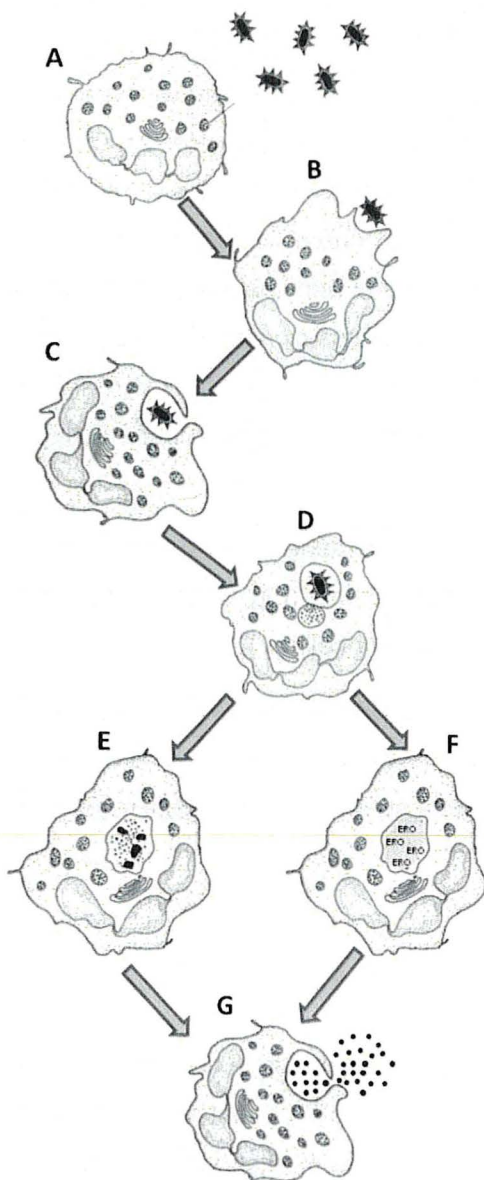


Figure 5 : Processus de phagocytose par une cellule phagocytaire ("Phagocytose," n.d.)

La phagocytose nécessite une activation des cellules compétentes, telles que les granulocytes phagocytaires, via les « motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) » et des cytokines qui induisent les réponses inflammatoires comme les « facteurs de nécrose tumorales (TNFs) » et « interleukines (ILs) » (Newton & Dixit, 2012). La 1<sup>ère</sup> étape est la migration. Les cellules phagocytaires sont attirées vers l'agent pathogène à cause des chimio-attracteurs relâchés généralement par les cellules ou tissus infectés ou encore par l'agent lui-même (Fig. 5-A). Les chimio-attracteurs vont stimuler le chimiotactisme cellulaire.

Chimiotactisme : phénomène par lequel des cellules (comme les phagocytes) dirigent leurs mouvements en fonction de certaines espèces chimiques présentes dans l'environnement

Le déplacement des cellules est possible grâce à la présence de pseudopodes qui sont à l'origine de l'élongation cytoplasmique (Allam and Pales Espinosa, 2016; Allam and Raftos, 2015; Gestal et al., 2008). Ensuite, il y a l'adhésion (2<sup>ème</sup> étape), pendant laquelle, il y a reconnaissance des pathogènes par les récepteurs présents à la surface de la membrane cytoplasmique de la cellule phagocytaire (Fig. 5-B). Puis prend place l'ingestion (3<sup>ème</sup> étape), qui engage le remaniement complexe de la membrane impliquant entre autres la polymérisation puis dépolymérisation des filaments d'actine.

Dans ce processus l'émission de pseudopodes vont englober la particule avant de l'internaliser dans une vésicule d'endocytose appelé phagosome (Fig. 5-C et 5-D). Ensuite il y a la digestion (4<sup>ème</sup> étape), qui prend place lorsqu'il y eu une fusion entre le phagosome et les lysosomes (formant ainsi les phagolysosome, Fig. 5-E et 5-F). Les enzymes sont directement déchargées à partir du lysosome qui fusionne dans le phagosome. Le phagolysosome est caractérisé par un pH acide (inférieur à 5,5) et une richesse en enzymes hydrolytiques fonctionnant à pH acide (Blanchette et al., 2009). Ce faible pH inhibe la croissance microbienne et améliore l'activité des enzymes de dégradation contenues dans le lysosome. Il existe deux principaux mécanismes de destruction des pathogènes dans les cellules phagocytaires : le système oxydant qui s'appuie sur la production de « *substances réactives de l'oxygène (ROS)* » et/ou « *des substances réactives azotées (RNS)* » (Fig. 5-F) et le système indépendant de l'oxygène qui fait intervenir des activités enzymatiques spécifiques (Fig. 5-E)

Finalement, lors de la 6<sup>ème</sup> étape, il y a la fragmentation qui mène à la destruction du phagolysosome. Les résidus sont expulsés de la cellule par exocytose (Fig. 5-G). Cette étape n'est pas systématique car elle dépend de l'agent pathogène et de la cellule.

L'interaction entre l'agent et les hémocytes peut se faire de façon directe *via* des récepteurs membranaires ou indirectement *via* des facteurs de reconnaissance dissous dans l'espace extracellulaire. Les cascades moléculaires qui en découlent impliquent de nombreuses molécules (Allam and Raftos, 2015).

### 1.2.2 Les médiateurs humoraux

Les médiateurs humoraux sont divisés en senseurs de pathogènes et en effecteurs immunitaires. Les senseurs de pathogènes sont responsables d'identifier le « non-soi » et sont regroupés sous le nom des « *récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs)* » tandis que les effecteurs moléculaires sont des protéines qui vont s'occuper de dégrader, d'éliminer ou de contrôler les infections. Les voies de signalisations et les facteurs de transcription sont responsables d'induire les effecteurs immunitaires lorsque la reconnaissance par les PRRs a été faite.



### 1.2.2.1 Les senseurs de pathogènes (PRRs)

Les PRRs peuvent reconnaître les pathogènes grâce aux PAMPs, présentes chez les microbes, telles que les « lipopolysaccharides (LPS) » ou les « peptidoglycanes (PGN) ». Chaque récepteur peut reconnaître un ou différents PAMPs et peut induire les cascades moléculaires adéquates. Il existe différents types de PRRs en fonction de la nature du pathogène. Dans le tableau suivant nous avons présenté les principaux PRRs. Les récepteurs présentés ci-dessus ont été identifiés chez les bivalves, néanmoins il existe un dernier groupe important encore non identifié : les récepteurs « NOD-like (nucléotide oligomerization domain receptors ou NLRs) » (Philipp et al., 2012).

Tableau 2 : Principaux senseurs de pathogènes associés à leurs localisations et leurs ligands.

Nom	Localisation	Ligand
<b>TLRs</b>	Intra et extracellulaire (endosome, membrane, plasma)	LPS, les bactéries gram positif et gram négatif, les flagellines, les virus et ADN simple et double brin et les champignons
<b>Lectines</b> ✓ CTL ✓ Galectines ✓ Lectine de type R ✓ Lectine de type F	Membranaire et plasmique	β -glucanes
<b>SR</b>	Membranaire	LPS, LTA, β-1,3-glucan
<b>PGRPs</b>	Membranaire	PGN
<b>GNBPs</b>	Membrane et plasmique	LPS et β-1,3-glucan
<b>LBP</b> s	Membrane et plasmique	LPS
<b>LGBP</b> s	Membrane et plasmique	LPS-β-1,3-glucan
<b>RLRs</b> ✓ RIG-1 ✓ MDA5 ✓ LGP2	Cytoplasmique	ARN et ADN

TLR: Récepteur de type Toll ; CTL : lectines de type C ; SR: Récepteur de Scavenger ; PGRP: Protéines de reconnaissance des peptidoglycanes ; GNBPs: Protéines de liaison au bactérie gram-négatif ; LBPs : protéines de liaisons au lipopolysaccharides ; LGBPs: protéines de liaison aux lipopolysaccharide-β-1,3-glucanes ; RLRs : récepteurs rétinioïque-like ; RIG-1 : retinoic acid-inducible gene-1 ; MDA5 : melanoma differentiation associated factor gene 5' ; LGP2 : laboratory of genetics and physiology 2 ; LPS: lippopolyschacarrides ; PGN: peptidoglycanes ; LTA: acide lipoteichoïque; GP: gram positif ; GN: gram négatif.

### 1. Les récepteurs Toll-like (TLRs)

Les TLRs sont une famille ancienne de récepteurs homologues au récepteur Toll identifié chez la drosophile (Kigerl et al., 2014). Ils sont capables de reconnaître un grand nombre de PAMP (Tableau 2). Actuellement, 130 TLRs ont été mis en évidence chez différents bivalves (Guo et al., 2015; Philipp et al., 2012). D'après Hibino et ses collaborateurs, la diversité et le nombre des TLRs résultent de l'absence d'un système immunitaire adaptatif (Hibino et al., 2006).

### 2. Lectines

Les lectines sont conservées et trouvées dans la majorité des animaux. Canesi et ses collaborateurs ont suggéré que les lectines peuvent agir comme un pont entre les bactéries et les hémocytes et faciliter ainsi la phagocytose (Canesi et al., 2002).

Il existe plusieurs types de lectines (Tableau 2). Cependant l'absence ou le peu d'information chez les bivalves sur les lectines de type R et F ainsi que sur les galectines ouvrent un champ d'étude pour l'identification et la caractérisation de nouveaux PRRs chez la moule bleue.

### 3. Les récepteurs de scavenger (SRs)

C'est une grande famille glycoprotéique dont les membres sont exprimés sur la surface de la membrane cellulaire (Wang and Wang, 2013). Ils sont souvent présents chez les macrophages et leur rôle et leurs fonctions sont le recrutement d'immunocytes et l'activation et la transformation de ceux-ci. Ils sont responsables du transport et de la métabolisation du cholestérol et des lipides ainsi que de la reconnaissance des pathogènes et de la phagocytose (Kigerl et al., 2014). Les SRs sont très peu étudiés chez les mollusques et nous n'avons que peu de connaissances sur ces récepteurs chez les bivalves.

### 4. Les PGRPs, GNBPs, LBPs et LGBPs

Ce sont différentes familles de protéines intra et extracellulaires ayant des fonctions pléiotropiques depuis la reconnaissance des PAMPs (Tableau 2), du clivage enzymatique jusqu'à l'action antimicrobienne. Ils peuvent favoriser la phagocytose, activer les « *peptides antimicrobiaux (AMPs)* » et le « *système pro-phénoloxydase (proPO)* » via les voies TLRs et provoque la mélanisation des bactéries gram positif et gram négatif. Ils peuvent aussi activer la voie « *immune deficiency (IMD)-like* » (Wang and Wang, 2013).

## 5. Les récepteurs retinoic acid-inducible 1-like (RLRs)

Les RLRs sont des récepteurs cytoplasmiques qui protègent les cellules contre une infection de virus ARN. Il en existe trois: « *retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-1)* », « *melanoma differentiation associated factor gene 5' (MDA5)* » et « *laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2)* ». Ils permettent l'induction des cytokines et des IRF de type I. Les mécanismes moléculaires et les voies de signalisations moléculaires sont les mêmes que pour les TLRs (Philipp et al., 2012). Les deux premiers, RIG-1 et MDA5, ont été identifiés chez les mollusques tandis que le troisième est très peu étudié.

Une fois que les PRRs ont détectés les pathogènes ou le corps étranger, les cellules immunitaires vont activer les effecteurs immunitaires.

### 1.2.2.2 Les effecteurs immunitaires

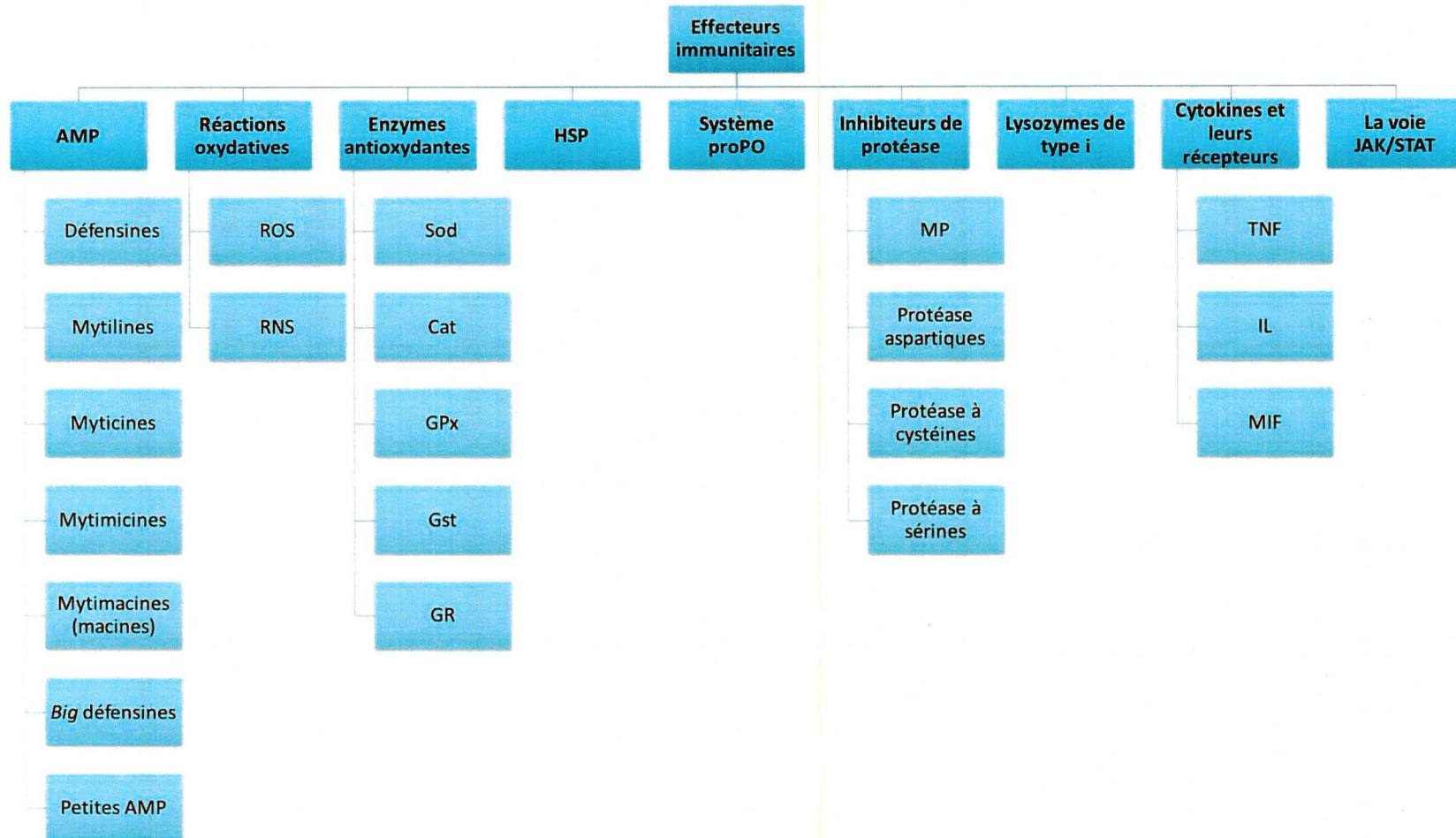
Les effecteurs immunitaires sont des protéines qui vont dégrader, éliminer ou contrôler les infections lorsque la présence d'un « non-soi » est identifiée par les PRRs. Il existe plusieurs effecteurs immunitaires (Fig. 6).

#### 1. Les peptides antimicrobiaux (AMPs)

Les AMPs sont des molécules ayant des fonctions antibiotiques *via* deux voies : i) elles se fixent sur la membrane bactérienne, la déstructurent et atteignent ainsi l'intégrité des bactéries ; ii) elles rentrent directement dans l'agent microbien et interagissent avec des cibles cellulaires responsables de la croissance ou du métabolisme, menant à la mort du microorganisme (LvYun et al., 2013). Les AMPs peuvent être véhiculés par l'hémolymphe (Soudant et al., 2013). Il en existe plusieurs ayant des structures différentes (Gerdol and Venier, 2015) : i) les défensines qui sont ubiquitaires et ont une activité anti-microbienne importante. Elles sont impliquées dans les défenses extracellulaires ; ii) les mytilines qui sont fortement exprimées dans les hémocytes ; iii) les myticines qui sont des peptides ayant une activité plus spécifique pour les bactéries à gram positif (Gerdol and Venier, 2015; LvYun et al., 2013) ; iv) les mytimicines, elles sont exclusivement antifongiques et agissent à la fois au niveau intracellulaire et extracellulaire (Gerdol and Venier, 2015) ; v) les mytimacines (ou macines) qui sont une famille émergente de AMPs relativement peu étudiée, mais présente chez les mollusques.



Elles ne sont pas présentes dans les hémocytes ; vi) les big défensines : elles sont exprimées dans les hémocytes, mais sont très peu étudiées donc leurs fonctions ne sont pas bien connues et pour finir vii) les petits AMPs qui ont été identifiés chez les mollusques, et qui inhibent les bactéries à gram négatif et positif et les champignons.



**Figure 6 : Liste des différents effecteurs immunitaires retrouvés chez bivalves.**

AMP : peptides antimicrobiens ; HSP : heat shock proteins ; proPO : pro-phénoloxylase ; JAK/STAT : Janus kinases/ transducteurs de signal et activateurs de transcription; ROS : substances réactives de l'oxygène ; RNS = substances réactives azotées ; Sod : super oxyde dismutase; Cat : catalase; GPx : glutathion peroxydase ; Gst : glutathion-s-transférase; GR : glutathion réductase; MP : métalloprotéines; TNF : Facteur de nécrose tumorale; IL : Interleukines; MIF : Facteurs de migration des macrophages.

## 2. Les stress oxydatifs et nitriques

Les ROS, des radicaux libres, sont constamment générées lors d'une exposition aux pathogènes ou à des stress environnementaux et/ou chimiques. Elles provoquent les stress oxydatifs et induisent la perte de fonction cellulaire. La production de ROS est initiée par l'attachement de particules étrangères sur la membrane plasmique des hémocytes. Il en découle une cascade de réaction impliquant de nombreux radicaux ( $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$ ,  $^1O_2$ ) et diverse enzymes telles que la « *superoxyde dismutase (Sod)* » ou encore la « *catalase (Cat)* » (Buggé *et al.*, 2007). La production de ROS associée à la phagocytose a été mise en évidence chez de nombreuses espèces de bivalves comme *C. virginica*, *C. gigas*, *O. edulis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *Mercenaria mercenaria*, *Pecten maximus (P. maximus)*, et *R. philippinarum* (Cima *et al.*, 2000; Gagnaire, 2005; Wootton *et al.*, 2003).

L'« *oxyde nitrique (NO $^\cdot$ )* » est un radical libre provenant de l'oxyde nitrique synthase. Grâce à sa charge et son rayon il peut traverser les membranes cellulaires facilitant ainsi les dommages sur « *l'acide désoxyribonucléique (ADN)* », sur les lipides ou sur les enzymes des pathogènes étrangers. Il peut aussi réagir avec les ROS (principalement  $O_2^-$ ) créant des molécules plus agressives (ONOO $^-$ ). Néanmoins, étant un radical libre cette molécule à double face peut tout aussi bien réagir avec les ROS qu'engendrer des effets toxiques dans son propre milieu, c'est à dire dans la cellule hémocytaire (Barcia and Ramos-Martínez, 2011; Villamil *et al.*, 2007).

La production des principales espèces réactives de l'oxygène par les hémocytes des bivalves stimulés s'effectue aussi bien à l'extérieur de la membrane cellulaire qu'à l'intérieur du phagosome (Donaghy *et al.*, 2012). Pour contrecarrer la génération de ROS, des enzymes antioxydants comme les Sod, les Cat, les « *glutathion peroxidase (GPx)* », les « *glutathion-s-transferase (Gst)* » ou les « *glutathion reductase (GR)* » sont induites.

## 3. Enzymes antioxydants

La fonction de ces protéines est de métaboliser les ROS en molécules moins toxiques. Les Sod et les Cat sont des enzymes qui catalysent le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, tandis que les GPx catalysent les hydroperoxydes organiques *via* l'utilisation de glutathion comme donneur d'hydrogène. Les Gst catalysent les attaques neutrophiles menant à des métabolites moins toxiques (LingLing *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Généralement, les niveaux de messagers codant pour les enzymes anti-oxydantes sont augmentés en conditions de stress (Yu *et al.*, 2011).



Par exemple, une augmentation des niveaux de transcrits de SOD a été décrite chez *C. gigas* et *Haliotis discus discus* (*H. discus*) après un stress thermique et un stress induit par les métaux (Boutet et al., 2003; Kim et al., 2008).

#### 4. Heat Shock Protéine (HSP)

Les HSP sont des protéines ubiquitaires conservées au cours de l'évolution génétique qui modulent le stress et protègent les cellules des dommages. Leur rôle est la protection, le maintien et la régulation des fonctions des protéines auxquelles elles sont associées. Elles sont classées en plusieurs familles en fonction de leur poids moléculaires : les HSP90, les HSP70, les HSP60, les HSP47 et celles de petite taille. Elles sont induites par la température, la salinité, les métaux, les polluants et les bactéries. Elles stabilisent et replient partiellement les protéines dénaturées ou servent d'intermédiaire dans la dégradation des protéines endommagées (Araya et al., 2010; Cellura et al., 2007, 2006). Elles sont utilisées comme biomarqueurs dans des programmes de biosurveillance (Fabbri et al., 2008). En effet, une augmentation des niveaux d'expression des gènes codants pour les HSPs chez les huîtres *C. gigas* et les moules *M. galloprovincialis* a été montrée après un stress thermique et après une exposition à des métaux lourds (Boutet et al., 2003 ; Piano et al., 2004 ; Franzellitti et Fabri, 2005).

#### 5. Le système phénoloxydase (proPO)

La « *phénoloxydase (PO)* » est une enzyme riche en cuivre avec une activité oxygénase qui est capable de convertir les monos ou diphénols en quinones. Les quinones sont ensuite polymérisées en mélanine. La mélanine et ses nombreux métabolites intermédiaires sont impliqués dans la phagocytose, l'encapsulation, mais aussi dans des pansements de blessures (Muñoz et al., 2006). Chez les bivalves ce système prend place dans l'hémolymphe lorsque les PRRs reconnaissent un pathogène (principalement les  $\beta$ -1,3-glucan et les LPS des bactéries à gram négatif). Il y a ensuite activation de différentes POs: *laccase-type*, la *catéchol-type* et la *tyrosinase-type* (Jiang et al., 2014). Cette activation va initier l'activité oxygénase et la production de mélanine. Cette cascade défensive a été identifiée dans l'hémolymphe des bivalves tels que les moules *M. edulis* (Coles et Pipe, 1994) et *P. viridis* (Asokan et al., 1997), les huîtres *Saccostrea glomerata* (*S. glomerata*) et *C. gigas* (Luna-González et al., 2003).

## 6. Inhibiteurs de protéase

Beaucoup de pathogènes produisent des protéases afin de moduler l'immunité des cellules hôtes. Les protéases sont des enzymes qui brisent les liaisons peptidiques de certaines protéines. Leur inactivation est essentielle pour la protection de l'organisme *via* l'activation des inhibiteurs de protéases. Il existe chez les bivalves plusieurs inhibiteurs : les protéases aspartiques, les « *métalloprotéases (MP)* », et les protéases à cystéine et sérines (Kazal-type et Kunitz-type)(Gerdol and Venier, 2015; Kumaresan et al., 2015).

Leur activation est impliquée dans la coagulation de l'hémolymphe, l'activation des proPo ainsi que dans la synthèse des AMPs et des cytokines (Xue et al., 2009). Elles inhibent chacun des groupes majeurs de protéases qui sont définis en fonction des acides aminés de leurs sites catalytiques.

## 7. Lysozymes

Les lysozymes sont des protéines antimicrobiennes. Elles sont capables d'hydrolyser les peptidoglycanes, principalement des bactéries à gram positif (Gerdol and Venier, 2015) et de faciliter leur phagocytose (Soudant et al., 2013). Trois familles ont été identifiées chez les organismes vivants : les *c-types* (pour chicken), les *g-types* (pour goose) et les *i-types* (pour invertébré) (Olsen et al., 2003). Chez le mollusque, elles se trouvent dans l'hémolymphe et le manteau, et elles appartiennent à la catégorie des *i-lysosomes* (Olsen et al., 2003).

## 8. Cytokines et les récepteurs des cytokines

Les cytokines sont un grand groupe hétérogène de molécules médiatrices qui comprend les « interleukines (IL) », les « interférons (IFNs) », les « facteurs de nécrose tumorales (TNF) », les « facteurs d'inhibition de migration des macrophages (MIFs) » et les chémokines. Elles sont responsables de l'inflammation lors d'un stress cellulaire. Elles sont souvent initiées par les facteurs de transcription et sont induites lors de la reconnaissance des pathogènes par les TLRs et les PRRs intracellulaires. Elles régulent aussi les activités physiologiques comme le développement ou la réparation tissulaire.

Les IFNs et les chémokines n'ont pas été identifiés chez les bivalves bien que ces derniers possèdent les voies de signalisation et les facteurs d'induction des IFNs (Gerdol and Venier, 2015).

Les TNFs sont des cytokines transmembranaires qui se lient aux domaines riches en cystéine. Ils ont plusieurs fonctions dans l'apoptose, la phagocytose, mais aussi dans la différenciation et la prolifération cellulaire. Ils sont capables d'interagir directement avec certaines bactéries.

Les Interleukines sont une grande famille de cytokines qui est composée de plus de 25 membres. Cependant chez les bivalves, seules l'IL-17 et l'IL-1 ont été identifiées (Malagoli, 2010; Roberts et al., 2008).

Les MIF sont des cytokines anciennes et conservées. Elles sont souvent associées au système immunitaire adaptatif mais émergent, actuellement, comme un médiateur important du système immunitaire inné (Philipp et al., 2012). Cependant il existe encore peu d'information sur les MIFs chez les bivalves.

#### 9. La voie moléculaire JAK/STAT

La voie des JAK/STAT est un système moléculaire conservé induit par les cytokines. JAK est induit par le récepteur des cytokines. STAT est phosphorylé par JAK afin d'entrer dans le noyau. Une fois dans le noyau, STAT module l'expression de plusieurs gènes impliqués dans les réactions du système immunitaire, dont ceux codant pour les cytokines (Canesi et al., 2006). En plus de l'activation des STATs, les JAKs servent d'intermédiaires dans le recrutement de molécules telles que les « *mitogen-activated protein kinases (MAPK)* ». Le rétrocontrôle des cytokines et des autres systèmes immunitaires est essentiel afin de contrôler les processus inflammatoires. Ces derniers sembleraient faciliter la pathogénèse lors d'une infection si ils ne sont pas contrôlés adéquatement par la cellule (Canesi et al., 2006, 2003). SOCS agit dans la rétroaction de telle sorte que son expression est régulée à la surexpression de STAT.

Les effecteurs immunitaires sont activés lorsque les PRR ont préalablement identifiés un « non soi ». Cette activation est possible grâce aux facteurs d'inductions.



### 1.2.3 Les facteurs de transcription

Les processus en aval des PRRs sont gérés par les facteurs de transcription tels que le NF- $\kappa$ B et le IRF.

#### 1. Le facteur nucléaire de kappa B (NF- $\kappa$ B)

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est la clé des processus cellulaires comme la prolifération cellulaire, la survie ou l'immunité. Le NF- $\kappa$ B est un homo- ou hétérodimère formé de : p50 (NF- $\kappa$ B1), p52 (NF- $\kappa$ B2), p65 (RelA), RelB et Rel. NF- $\kappa$ B est en partie régulé dans le cytoplasme de la cellule par un complexe protéique composé des « protéines kinases IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  » et de la protéine «NF- $\kappa$ B *Essential Modulator (NEMO/IKKg)* ». Il joue un rôle dans la répression ou l'activation des gènes, et est retenu dans le cytoplasme par la protéine inhibitrice I $\kappa$ B- $\alpha$ . La dégradation de I $\kappa$ B- $\alpha$  par phosphorylation et ubiquitination permet la translocation de NF- $\kappa$ B jusqu'au noyau et l'activation de la transcription des gènes cibles. Chez les mollusques, des membres de la famille Rel, ont été trouvés dans différents bivalves.

#### 2. Les facteurs de régulation des interférons (IRF)

Les IRFs ont été caractérisés comme des régulateurs de type 1 ou des stimulateurs des interférons chez les vertébrés. Les IRFs sont présents chez tous les métazoaires et ont été trouvés aussi chez les porifères, placozoaires, cténophores et cnidaires.

Chez les cnidaires et les bivalves, les IRFs sont divisés en IRF-1 et les IRF4. Les fonctions des IRFs sont bien connues chez les vertébrés mais très peu étudiées chez les invertébrés (Tanguy, 2013)

## 1.2.4 Le système complémentaire, l'apoptose et l'autophagie

### 1. Le système complémentaire

Le système complémentaire est un système ancien pro-inflammatoire. Il est composé de plus d'une trentaine de molécules qui, *via* trois voies (la voie classique, la voie alternative et la voie des lectines), vont réagir et détruire les agents étrangers. Il accélère la phagocytose, active les mécanismes des lectines, détruit les microbes et active l'inflammation cellulaire (Bohlsón et al., 2007; Guo et al., 2015). Le composant principale est « *complément (C) 3* » qui est activé grâce au « facteur B (Bf) ». Cependant aucun composant central n'a été identifié chez les bivalves à l'exception de C3 (Moreira et al., 2012; Prado-Alvarez et al., 2009). Ce système est aussi considéré comme un PRRs par sa capacité à reconnaître différents PAMPs *via* le composant C1q (Gestal et al., 2010). Classiquement, C1q est connu pour être la protéine de reconnaissance cible de la voie classique du complément, en jouant un rôle crucial dans l'immunité adaptative (Medzhitov and Janeway, 2002; Bohlsón, Fraser et al., 2007). Des études récentes du transcriptome et génome d'invertébrés ont montré qu'il existe une grande diversité de C1q (168 trouvés chez *M. galloprovincialis*, 564 chez *M. edulis*, 321 chez *C. gigas* et 187 chez *C. virginica*). On suppose que la grande quantité de C1q chez les bivalves serait due à l'absence du système adaptatif ce qui confirmerait l'hypothèse de Nonaka comme quoi le système complémentaire des mollusques pourrait être différent du système complémentaire des vertébrés (Gerdol and Venier, 2015; Gestal et al., 2010; Nonaka, 2011).

### 2. L'apoptose et l'autophagie

La mort cellulaire est une réponse fondamentale face à un stress immunitaire et elle se divise en trois voies différentes : la nécrose, l'apoptose et l'autophagie.

Les processus de l'apoptose ont été décrits pour les vertébrés et les invertébrés incluant les mollusques. L'apoptose conserve un rôle essentiel dans les fonctions homéostatique et dans le système immunitaire inné par l'élimination des cellules endommagées sans toutefois induire les systèmes d'inflammation. De façon générale, l'apoptose peut suivre deux voies interconnectées (Fig. 7-A) : la voie de mort cellulaire intrinsèque et la voie extrinsèque. La première voie inclut des molécules pro-apoptotiques et résulte en la libération de protéines mitochondriales (telles que le « *cytochrome-c (cyt-c)* », « *second mitochondria-derived activator of caspases (SMAC/DIABLO)* », etc) vers le cytosol.

La voie extrinsèque fait appel à des ligands qui vont se lier aux récepteurs de la grande famille des TNF. Ceux-ci vont induire l'apoptose *via* le recrutement des « *domaine protéiques FAS associés à la mort (FADD)* ». Les deux voies convergent vers l'induction des caspases.

La plupart des caspases et d'autres molécules impliquées dans l'apoptose ont été identifiées chez *M. galloprovincialis* et chez *C. giga* (Romero et al., 2011; Sokolova, 2009; Zhang et al., 2011) (Philipp et al., 2012). Les connaissances actuelles sur l'apoptose permettent d'affirmer que les vertébrés et invertébrés partagent des processus similaires. L'apoptose chez les bivalves est très bien décrite par Romero et ses collaborateurs (Romero et al., 2015).

L'autophagie (Fig. 7-B), qui ne mène pas forcément à la mort cellulaire, crée des vésicules à double membrane qui emprisonnent les particules intruses formant un autophagosome (Moore et al., 2007). Celui-ci fuse avec les lysosomes pour une dégradation enzymatique. Les principaux acteurs de ce phénomène sont les « *mechanistic target of rapamycin (mTOR)* » et un large groupe de gène (ATG) qui sont impliqués dans l'induction et l'inhibition de ce processus et dans la formation des autophagosomes (Levine, 2005). De récentes études ont démontré l'importance de ce processus dans le système immunitaire, que ce soit comme un effet en aval de la reconnaissance par les PRRs ou comme l'implication de LC3 (ATG8) dans la phagocytose (Philipp et al., 2012). L'autophagie est très bien décrite par les études écotoxicologiques pour des stress oxydatifs, chimiques ou environnementaux sur différents modèles biologiques ou modèles cellulaires mais il y a peu d'informations de ce processus pour le système immunitaire.

**Le système immunitaire des bivalves se compose donc de cellules hématocytaires et de médiateurs humoraux. Conjointement ils sont responsables de la protection de l'organisme. Tous ces récepteurs, ces domaines, ces protéines et ces voies de signalisation et transductions décrits auparavant et résumés dans la figure 8, sont souvent ciblés dans les études visant à comprendre et à identifier les interactions entre les pathogènes et les cellules hôtes. Néanmoins, grâce aux nouvelles technologies, l'étude des effets des contaminants sur ces molécules et processus est en expansion. Parmi les contaminants qui pourraient interagir et modifier les processus immunitaires il y a le cadmium, un métal toxique dissous, qui pose problèmes au niveau mondial**



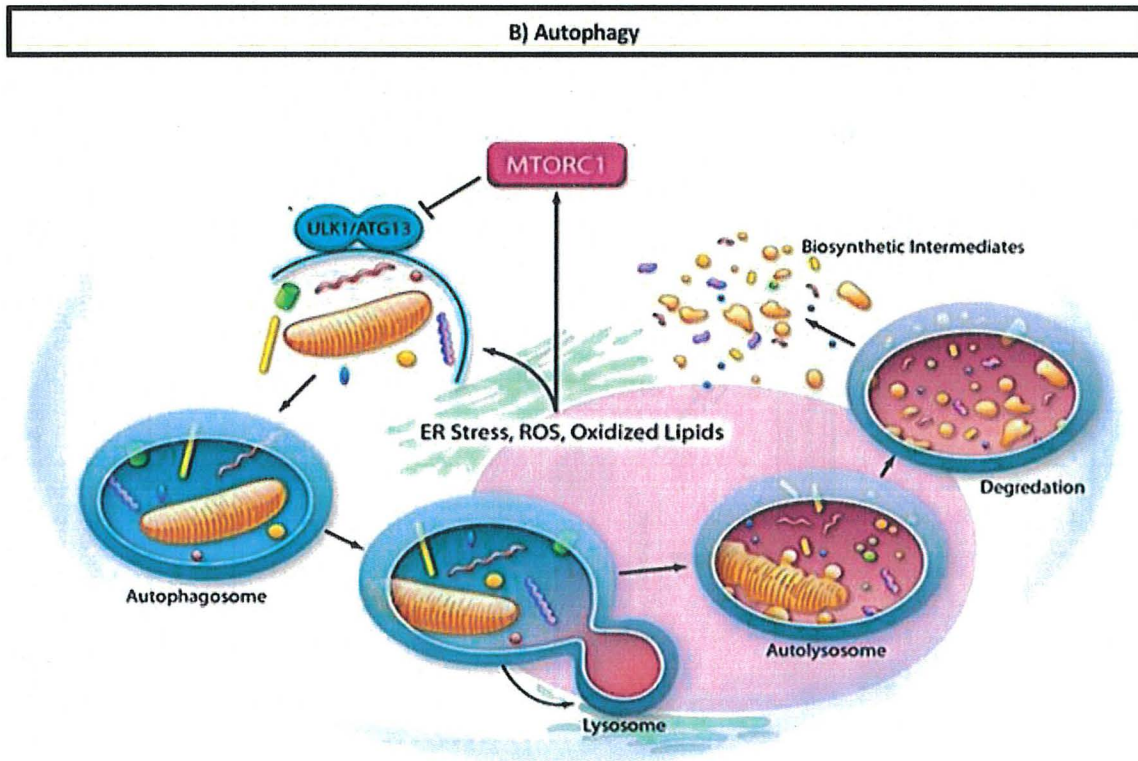
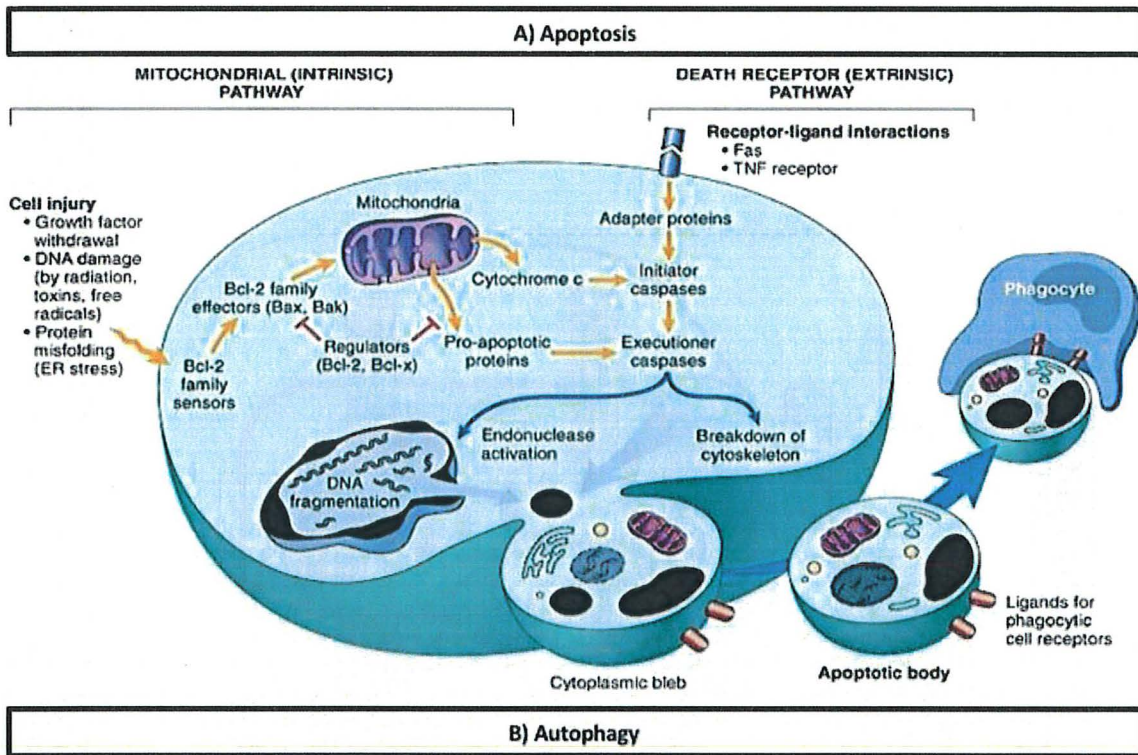


Figure 7 : A) Apoptose cellulaire *via* la voie mitochondriale (ou intrinsèque) et *via* la voie extrinsèque. B) Autophagie cellulaire : induction des mTOR, des ATG par un stress cellulaire. (modifié de Cavallasca, 2017; Kumar et al., 2015)

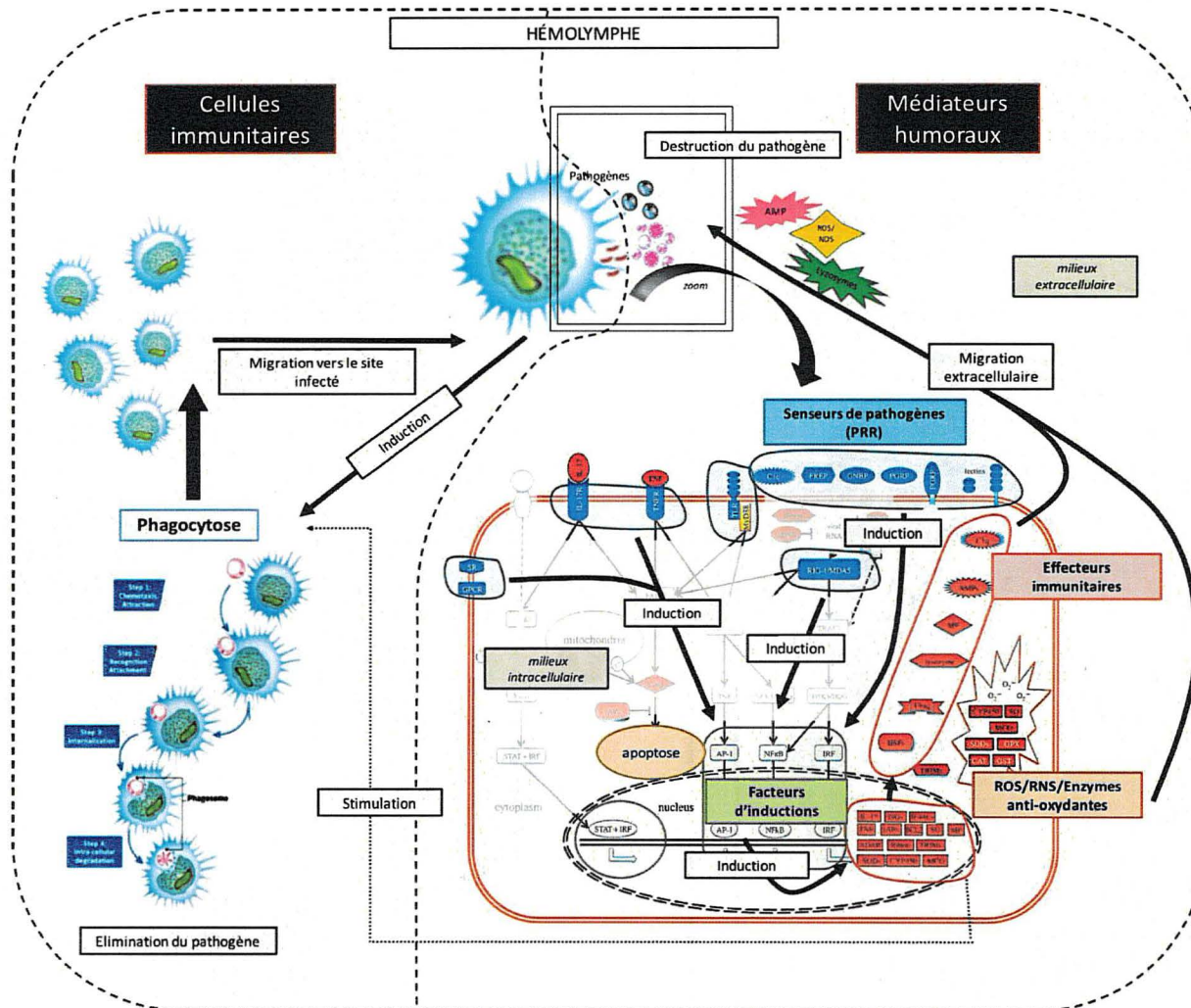


Figure 8 : Interactions entre les différents composants immunitaires retrouvés dans l'hémolymphe des bivalves. Implication des senseurs des pathogènes, des effecteurs immunitaires, des facteurs d'induction, des ROS/RNS et des enzymes antioxydants, de l'apoptose et de la phagocytose. Cellules immunitaires = phagocytose. Médiateurs humoraux = en bleu claire : les senseurs de pathogènes ; en vert : les facteurs d'inductions ; en rouge : le stress oxydatif, la défense antioxydants et l'apoptose.



## 1.3 Le cadmium

### 1.3.1 Description du cadmium et de son utilisation

Le « *cadmium* (*Cd* ; CAS 7440-43-9) » est un métal luisant d'un blanc doux, teinté de bleu, rarement trouvé à l'état pur. C'est un métal bivalent ( $\text{Cd}^{2+}$ ) non essentiel, présent naturellement dans les eaux, les sols et l'atmosphère. On estime que sa concentration moyenne terrestre est comprise entre 0,1 et 0,5 partie par million (g de cadmium par Kg de sol) (Damy, 2011). Les sources naturelles du Cd sont les éruptions volcaniques (820 tonnes/an), les feux de forêts (1-70 tonnes/an) et l'érosion des sols (Waisberg et al., 2003). Il a ainsi été estimé que les apports naturels de Cd étaient d'environ 800 à 1000 tonnes par an dans l'environnement (Association International Cadmium, 2009).

Les sources anthropiques sont principalement l'extraction de la blende (zinc) en tant que sous-produit, son utilisation dans les batteries, les pigments, les revêtements de surface, les stabilisants de matières plastiques, les pesticides et le tabac (Olabarrieta et al., 2001; Waisberg et al., 2003). Les émissions anthropiques ont ainsi été évaluées à 17 000 tonnes par an. L'« *organisation Mondiale de la Santé (OMS)* » a estimé que 15 000 tonnes par an de Cd étaient transportées par les rivières vers les océans (Aparicio-González et al., 2012; Damy, 2011).

Actuellement le Cd est répertorié comme substance prioritaire (substance à éliminer ou réduire) par l'« *Agence américaine de Protection de l'Environnement (EPA)* » (EPA, 2012), par Environnement Canada (Canada, 2013) et par la DCE en Europe (DEC, 2001). Il est classé comme cancérigène par la DCE et l'EPA (DEC, 2001; EPA, 2012). Chez l'humain, le cas de contamination (aigüe et chronique) le plus important et impressionnant actuellement connu est celui de la contamination d'une rivière du Japon. Elle a engendré chez l'humain, la maladie d'Itaï Itaï, qui se caractérise par des fractures osseuses et par un dysfonctionnement rénal (He et al., 2013; Zhang et al., 2014).

Le Cd est non-biodégradable et donc s'accumule dans l'environnement. Cependant, son comportement vis à vis de son environnement dépend de plusieurs facteurs abiotiques dont la salinité mais aussi de son affinité pour les molécules biologiques.



## 1.3.2 Comportement et toxicité du cadmium

### 1.3.2.1 Comportement du cadmium

La toxicité d'un métal dépend de plusieurs facteurs physico-chimiques. Une classification des métaux a été proposée par Nieboer et Richardson en 1980. Elle se base sur les propriétés de complexation des métaux (Nieboer and Richardson, 1980). Les métaux sont ainsi catégorisés en trois groupes en fonction de leur affinité pour les ligands contenant l'oxygène, le soufre et l'azote (Tableau 3) (Abboud, 2012).

Tableau 3 : Classification des métaux en fonction de leurs affinités pour les ligands riches en oxygène, azote et soufre.

Catégorie / affinité	Métaux
<b>A : -O</b>	Li, Na, K, Cs, Ca, Ba, Sr, Mg, Be, Al
<b>B : -S, -N</b>	Ag, Au, Ti, Hg, B, Ti Pb
<b>Intermédiaire (borderline) : -O, -S, -N</b>	Mn, V, Zn, Ni, Fe, Co, Cd, Cu, Sn, Cr, Fe, As, Sn, Sb

-O: oxygène ; - S: soufre ; -N: azote

Cette classification permet aussi de prédire le comportement d'un métal dans l'environnement et son interaction avec les organismes (Brian A. Whitton, 1994). En effet, les métaux de la catégorie intermédiaire, tel que le Cd, ont présenté et présentent aujourd'hui une plus forte toxicité pour les organismes dû à leur affinité des ligands (comme par exemple avec les acides aminés, les acides nucléiques ou encore les histines) contenant les trois anions cités précédemment (Abboud, 2012). En plus de cette propriété de complexation, la forme chimique du métal, sa taille moléculaire, son rayon, les liaisons possibles avec les éléments du milieu environnant... ont un rôle primordial sur les capacités du métal à surmonter les barrières biologiques afin de pouvoir agir. Les effets sur les organismes dépendent surtout de la spéciation du métal (et aussi bien sûr de la dose et du temps d'exposition).

Les paramètres les plus déterminants pour la spéciation d'un métal sont le pH et la salinité de la solution dans laquelle il se trouve (voir figure 9)(Achard-Joris, 2005).

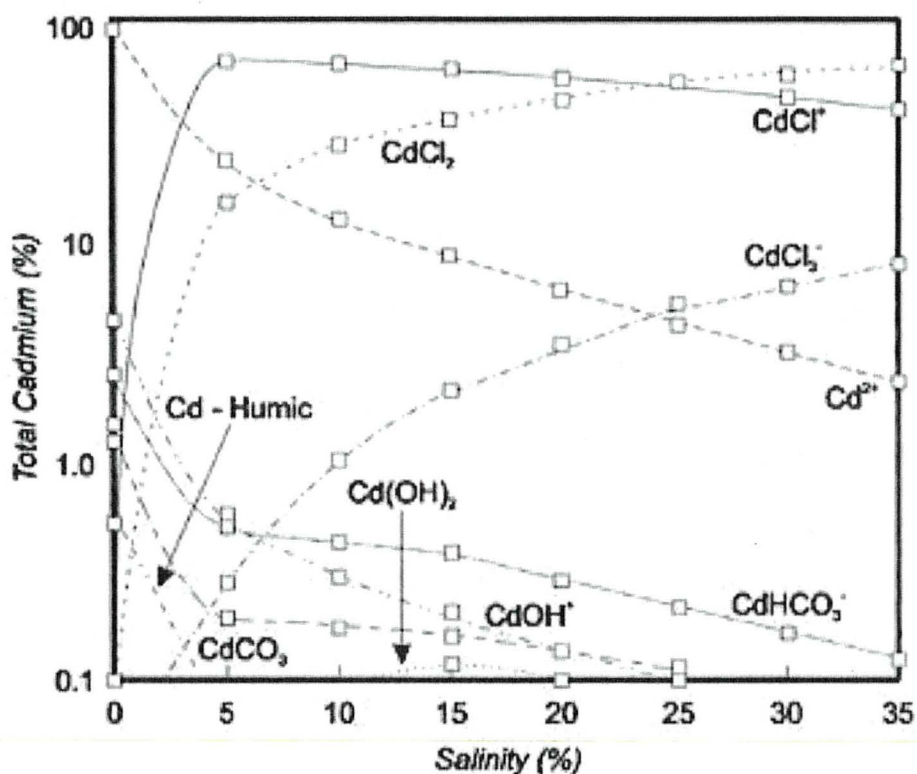


Figure 9 : Répartition des espèces chimiques du cadmium dissous dans une solution en fonction de la salinité à pH 8 (Møhlenberg and Jensen, 1980)

À un pH 8 et une salinité entre 30 et 35 (salinité des écosystème marins), le Cd se retrouve associé au chlore, CdCl<sub>2</sub> ou sous la forme ionique CdCl<sup>+</sup>, CdCl<sub>2</sub><sup>-</sup> et Cd<sup>2+</sup>. La spéciation a une forte conséquence sur la biodisponibilité et bio-accessibilité du métal ainsi que sur son interaction avec les barrières biologiques (organismes, tissus, cellules) (Adriano, 2001). Il existe plusieurs modèles pour prédire la spéciation des métaux telle que le modèle de l'ion libre (FIAM) ou encore le modèle du ligand biologique (BLM). Ces modèles permettent de « modéliser » les interactions entre les métaux, les ligands présents dans la solution et les barrières biologiques (Annexe II).

Dans les milieux aquatiques c'est sous la forme Cd<sup>2+</sup> que le Cd est le plus toxique et le plus bio-accessible pour les organismes aquatiques (Peakall and Burger, 2003). Sous cette forme le Cd possède des propriétés physico-chimiques très proches de celles du calcium (Ca) telles que sa charge (2+), le ratio entre sa charge et son rayon (Ca<sup>2+</sup> = 2.02 C/Å, Cd<sup>2+</sup> = 2.06 C/Å) ainsi que son rayon ionique (Ca<sup>2+</sup> = 0.97 Å, Cd<sup>2+</sup> = 0.99 Å) (Jacobson and Turner, 1980; Thévenod, 2009).

Sa classification (catégorie intermédiaire), sa spéciation mais aussi ses propriétés chimiques proches du calcium ont permis de mettre en évidence qu'il est capable de pénétrer dans les cellules *via* les voies calciques, de remplacer le calcium dans les protéines ayant des sites de liaisons calciques (comme la « *calmoduline (Calm)* »), de se lier aux sites riches en thiols (sulfhydryl ou encore thioether) ou riches en azote (amines, imidazoles, histidines, nucléotides, etc), de se lier au pont disulfure et de remplacer le Zn (notamment dans les facteurs de transcription riches en doigt de zinc) modifiant ainsi la transcription de nombreux gènes (Jacobson and Turner, 1980; Kothinti et al., 2010; Thévenod, 2010).

### 1.3.2.2 Toxicité du cadmium

La toxicité du Cd a été étudiée principalement chez l'humain. De façon générale, le Cd est connu pour être néphrotoxique, cancérigène, tératogène, reprotoxique, et il agit comme un perturbateur endocrinien (Olabarrieta et al., 2001). Ses effets sont dus à des actions directes sur les tissus spécifiques ou, plus généralement, en agissant sur les mécanismes d'homéostasies (comme le système immunitaire). Une fois dans la cellule le cadmium se révèle être un métal toxique provoquant de nombreux effets (Fig. 10) (Waisberg et al., 2003).

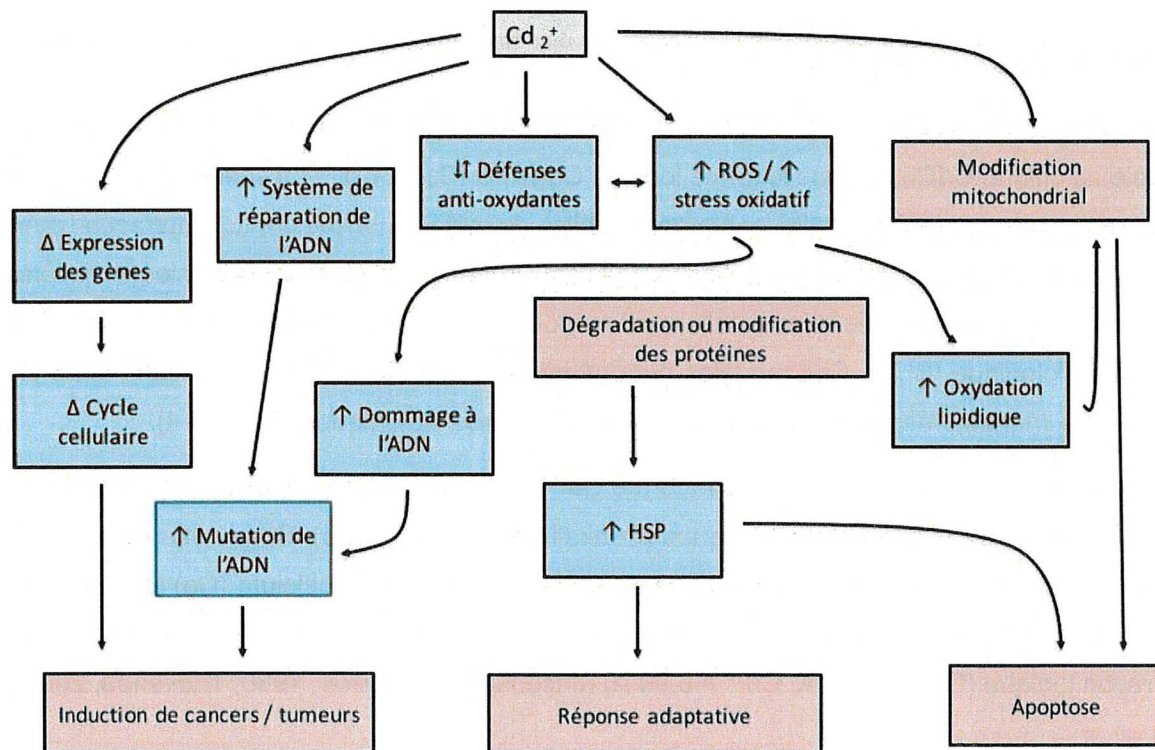


Figure 10 : Les effets toxiques du Cd d'un point de vue cellulaire (modifié de Bertin et al., 2006 )



### 1) Induction indirectes de ROS et modification de l'équilibre oxydant.

Le Cd n'est pas un métal rédox et donc ne catalyse aucune réaction de type Fenton. Cependant de nombreuses études ont démontrées que la présence de Cd induisait la production de ROS comme les radicaux hydroxyles ou le peroxyde d'hydrogène. Une autre voie d'induction des ROS est le déséquilibre homéostatique cellulaire, notamment parce que le Cd entre en compétition avec le calcium, mais aussi avec différents métaux essentiels (notamment le fer ( $\text{Fe}^{2+}$ )). Ceci aboutirait à des concentrations accrues en métaux libres dans le cytosol. Ces métaux seraient capables de réaliser des réactions de type Fenton (Cuypers et al., 2010; Liu et al., 2009) qui pourraient induire directement des ROS. Les conséquences de la production indirecte de ROS est qu'il se crée un déséquilibre entre les ROS et la production d'enzymes antioxydantes (qui ont pour objectif de lutter contre le stress oxydatif généré par les ROS). En effet, le Cd ayant une forte affinité pour le GSH, il peut épuiser les réserves cellulaires de GSH et ainsi favoriser l'action oxydante des ROS, produits constamment par le métabolisme cellulaire basal ou par d'autres composés xénobiotiques (Cuypers et al., 2010; Ercal et al., 2001). D'autres enzymes, telles que la Cat et la Sod, sont aussi impliquées dans la protection contre les ROS. Leur activité enzymatique dépend de la fixation de métaux réactifs (Fe, Mn, Zn, Cu, Se, etc.). Leur remplacement par le Cd ou l'interaction de celui-ci avec les groupements -SH de ces protéines, réduit leur activité favorisant le stress oxydatif (Cuypers et al., 2010). Le déséquilibre antioxydant et le Cd peuvent engendrer la dénaturation de nombreuses protéines (dont les protéines responsables de la protection cellulaire) en atteignant leur groupement thiol ou en se substituant au zinc de ces protéines. Ceci a été reconnu comme signal d'induction des HSPs. Ces dernières ont un rôle essentiel dans la réparation des protéines.

### 2) Modification du système mitochondrial.

Les mitochondries sont le siège des réactions métaboliques et de la respiration cellulaire (transfert d'électron ( $e^-$ ) et d'énergie) produisant couramment des ROS. Le Cd est suspecté d'interagir avec ces différentes protéines impliquées entraînant un fonctionnement anormal des mitochondries (Cuypers et al., 2010). Ceci a pour impact une augmentation des ROS ainsi que l'activation des voies pro-apoptotiques mais peuvent aussi atteindre l'intégrité cellulaire. En effet les ROS et le Cd peuvent induire l'oxydation des lipides augmentant la perméabilité cellulaire et modifiant les systèmes de respirations mitochondriales.

### 3) Inhibition des systèmes de réparation de l'ADN

Les conséquences du Cd et du stress oxydant sur la cellule peuvent provoquer des atteintes touchant l'ADN. Le Cd est faiblement mutagène en tant que tel. Cependant il peut inhiber la réparation de lésions de l'ADN formées spontanément ou à la suite de réactions oxydatives.

Il interfère avec des enzymes impliquées dans les réparations de ces lésions en se substituant au zinc de certaines protéines à doigt de zinc (Hartwig, 2001). Ces lésions peuvent devenir permanentes.

### 4) Moduler l'expression des gènes et la transduction du signal.

En plus des lésions à l'ADN, le Cd peut aussi influencer le niveau d'expression de gènes en interférant dans des voies de transduction du signal. Il peut également entraîner l'augmentation d'un autre messenger secondaire : le calcium intracellulaire (Joseph, 2009; Misra et al., 2002). La dérégulation intercellulaire de  $Ca^{2+}$  peut provoquer une dérégulation de l'expression de gènes de façon directe en interagissant avec certains facteurs de transcription ou de façon indirecte *via* l'activation de protéines kinases.

Le Cd induit aussi une surexpression des proto-oncogènes (comme *c-fos* et *c-jun*) *via* la protéine kinase C et la calmoduline (Choong et al., 2014). Ces proto-oncogènes codent pour des composants de facteurs de transcription, tels que NF- $\kappa$ B (Thevenod et al., 2000) qui à son tour va se lier à des régions promotrices de gènes impliqués notamment dans la réponse inflammatoire, la carcinogénèse, et les mécanismes anti-apoptotiques.

Ayant de telles capacités toxiques, nous nous sommes interrogés sur les concentrations de cadmium présent dans les écosystèmes aquatiques (eaux et bivalves).

## 1.3.3 Teneur du cadmium dans les écosystèmes aquatiques

### 1.3.3.1 Concentrations de cadmium dans les masses d'eaux

Une fois dans les systèmes aquatiques, le Cd peut se retrouver sous différentes formes (ioniques, complexes ou particulaires). Dans le tableau ci-dessous (Tableau 4), nous avons représenté les valeurs de Cd dissous ( $CdCl_2$ ) mesurées dans certains milieux aquatiques exposés et non exposés aux activités anthropiques. Les concentrations de Cd peuvent varier en fonction des milieux mais il est quand même présent dans tous les systèmes aquatiques.

D'un point de vue plus global, une étude faite par Aparicio-González et ses collaborateurs a permis de mettre en évidence des concentrations de Cd élevées dans les régions pacifiques d'Amérique du Nord et d'Asie allant de 1,17 à 1,31 nM avec un gradient de dilution vers les eaux plus profondes ce qui semble normal compte tenu de la forte activité minière présente dans ces zones (Aparicio-González et al., 2012). Dans l'Atlantique, les concentrations retrouvées sont plus faibles car les activités minières qui sont la source principale de Cd y sont plus faibles (Aparicio-González et al., 2012). Dans cette même étude, il est mis en avant que les concentrations de Cd (en nM) oscillent entre 0,59 et 0,87 dans le pôle Sud. Ces données sont alarmantes car si on compare les valeurs du tableau 4, nous pouvons observer que certaines eaux près des pôles ont des concentrations de Cd (de 0.59 à 0.87nM au pôle Sud et 0.15 à 0.44nM au pôle Nord) dans les mêmes ordres de grandeurs que celles retrouvées dans les estuaires et eaux interstitielles (allant de 0.044 à 5.49 nM) qui sont des milieux sous fortes pressions anthropiques.

Ces données sont choquantes car elles mettent en avant une dispersion du Cd dissous, qui peut avoir de fortes répercussions sur les organismes de ces milieux (Aparicio-González et al., 2012). Ces derniers ne sont pas adaptés à des concentrations aussi élevées de Cd dissous



**Tableau 4 : Concentration (ng/L et nM) de Cd dissous dans la phase liquide (eau) dans différents écosystèmes aquatiques (Damy, 2011)**

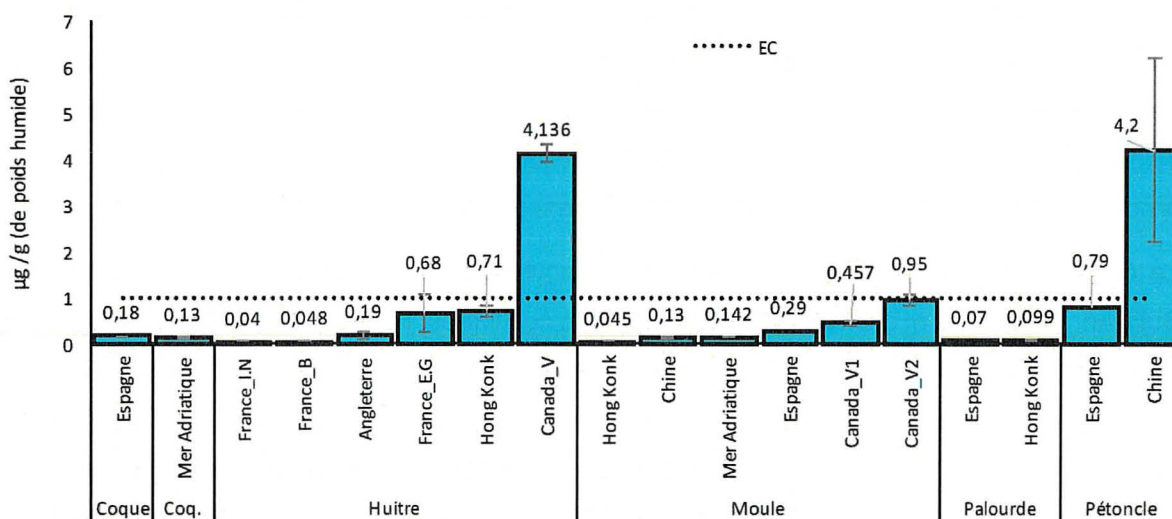
Type d'écosystème	Nom des sites	ng/L	nmol/L (nM)
<b>Eaux du large</b>	Atlantique	20 - 35	0,177 - 0,311
	Pacifique	80 - 110	0,711 - 0,978
<b>Eaux de surface</b>	Arctique	7 - 33	0,062 - 0,293
	Atlantique	0,2 - 16	0,001 - 0,142
	Pacifique	3 - 67	0,026 - 0,596
<b>Eaux côtières et estuaires</b>	Baie de Marennes-Oléron	13 - 23	0,115 - 0,204
	Gironde	10 - 393	0,088 - 3,496
	Loire	11 - 61	0,097 - 0,542
	Rhône	48 (moyenne)	0,427 (moyenne)
	La Seine - Poses	5 - 73	0,044 - 0,649
	La Seine - Estuaire	5 - 202	0,044 - 1,796
	Escaut	450 (maximum)	4,003 (maximum)
<b>Eaux interstitielles</b>	Hudson	618 (maximum)	5,497 (maximum)
	Saint-Laurent	6 - 582	0,053 - 5,177
	Fjord	10	0,088
	Pacifique équatorial	112 - 267	0,996 - 2,375
	Marge californienne	12 - 280	0,106 - 2,490
	Baie de Marennes-Oléron	5 - 170	0,044 - 1,512
Vasière Ouest-Gironde	60 - 400	0,533 - 3,558	

Nous nous sommes intéressés aux concentrations de cadmium dans les organismes aquatiques, filtreurs, c'est à dire, les bivalves. En effet, si on retrouve du cadmium partout au niveau du globe terrestre, alors qu'en est-il du cadmium dans les organismes vivant dans ces milieux?

### 1.3.3.2 Concentrations de cadmium dans les bivalves

Les bivalves sont des organismes qui subissent les pressions anthropiques. Étant sédentaires et filtreurs d'eau, ces derniers ne peuvent fuir leur environnement et par conséquent, ils sont donc soumis aux contaminations ou aux pressions de leur milieu de vie. De nombreuses études se sont inquiétées vis à vis des concentrations présentes dans les organismes filtreurs d'eau.

La figure suivante met en avant des concentrations de cadmium retrouvées dans différents bivalves en Asie, en Europe et en Amérique.



**Figure 11 : Concentrations de cadmium (en µg de Cd / g de corps frais) mesurées dans différents bivalves en Asie, Europe et Amérique (source : Amiard et al., 2008; Bendell, 2009).**

Coq = coquillage, France\_I.N = Ile Noirmoutier, France\_B = Bretagne, France\_E.G = Estuaire de la Gironde, Canda\_V=Vancouver ; Canada\_V1= Vancouver\_Zone1 ; Canada\_V2 – Vancouver\_Zone2 ; EC = norme appliquée aux mollusques en Europe (1 µg/g).

Nous pouvons constater que les concentrations dans les organismes varient en fonction des sites et des espèces. Dans le graphique, les plus fortes concentrations sont retrouvées chez l'huitre et le pétoncle. Pour la consommation humaine, les concentrations présentées ici sont au-dessous des concentrations admissibles d'après la norme Européenne (1 mg de Cadmium par Kg de poids frais). Dans certains sites, les bivalves ont quand même présenté des concentrations supérieures à celle acceptée pour la consommation humaine. Les concentrations retrouvées dans les bivalves sont liées à leur intense capacité à filtrer l'eau et à accumuler les métaux.

Nous pouvons constater que des concentrations de cadmium allant de 0,049 µg/g (soit du mg/Kg) jusqu'à 4,2 µg/g sont retrouvées dans les organismes alors que dans le tableau 4, les concentrations mesurées dans l'eau sont de l'ordre du ng/L. Cette différence d'ordre de grandeur

est dû à la capacité de ces organismes à accumuler les métaux (par filtration). Leur capacité à accumuler le Cd est accompagnée d'une grande tolérance vis à vis de ce métal. Néanmoins, de nombreuses études ont déjà mis en avant les effets néfastes de ces métaux sur ces organismes (Achard-Joris, 2005).

#### 1.3.4 Le cadmium et le système immunitaire des bivalves

Le système immunitaire est la première ligne de défense des organismes contre une infection extérieure ou tout aussi bien la contamination. Les effets du cadmium sur le système immunitaire ont été étudiés à maintes reprises. Le Cd est connu comme un immunosuppresseur pour beaucoup de vertébrés et invertébrés (Klaassen et al., 2009). Plusieurs études ont mis en évidence des effets du Cd sur la viabilité des cellules, la phagocytose, l'induction de ROS, la production des molécules du système immunitaire telles que les protéines antioxydants, etc.

Le cadmium semble augmenter la densité hémocytaires chez la moule et l'huître (Cheng and Sullivan, 1984; Pipe et al., 1995). Sur les fonctions cellulaires, Fournier et ses collaborateurs ainsi que Gagnaire et ses collaborateurs ont mis en avant une augmentation de la mortalité cellulaire chez plusieurs bivalves après une exposition au mercure et au Cd (Fournier et al., 2001; Gagnaire et al., 2004). Sauvé et ses collaborateurs ont mis en avant les effets de plusieurs métaux sur les fonctions phagocytaires de plusieurs bivalves (Olabarrieta et al., 2001; Sauvé et al., 2002). Une contamination à  $10^{-4}$  M semble suffisante pour diminuer significativement la phagocytose chez *M. edulis*.

En présence de Cd et de cuivre (Cu), Gomez-Mendikute et Cajaraville ont montré que les hémocytes de *M. galloprovincialis* prenaient une forme arrondie sans pseudopodes ou extension cellulaire (Gómez-Mendikute and Cajaraville, 2003). De même, Olabarrieta et ses collaborateurs ont constaté une perte d'actine au niveau du cytosquelette chez les hémocytes de *M. galloprovincialis* exposés à  $10^{-3}$  M de Cd (Olabarrieta et al., 2001). Ces effets ont pour conséquence une diminution des capacités phagocytaires et de mobilité des cellules hémocytaires. Le Cd peut provoquer une diminution des fonctions cellulaires telles que l'adhésion cellulaire, la stabilité du cytosquelette, le métabolisme cellulaire, l'homéostasie du calcium, mais aussi modifier de nombreux processus moléculaires étant essentiels au bon fonctionnement du système immunitaire. Tous ces processus ont un rôle essentiel dans la mobilité et l'attachement cellulaire ainsi que dans la phagocytose (Sokolova et al., 2004). Cependant, ceci n'est pas une liste exhaustive des effets du Cd sur les hémocytes de bivalves.



**Au niveau des processus moléculaires impliqués dans le système immunitaire lors des expositions aux xénobiotiques, il existe peu d'études chez les bivalves. Toutefois, avec les nouvelles technologies telles que le séquençage et la transcriptomie, ces processus semblent plus accessibles.**

## **1.4 La transcriptomie ou séquençage de l'ARN (RNA-seq)**

La transcriptomie est l'étude du transcriptome dont la définition fut proposée par Charles Auffray en 1996 (McGettigan, 2013): « *le transcriptome représente l'ensemble des ARN produit par une cellule ou une population cellulaire* ». Ce domaine permet l'étude dynamique des gènes en se basant sur les méthodes de séquençage traditionnelles.

### **1.4.1 L'histoire du séquençage**

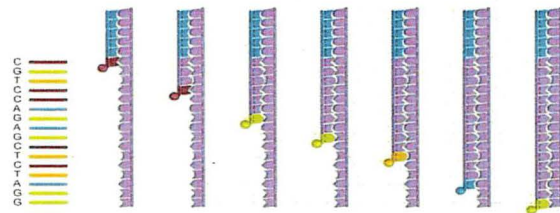
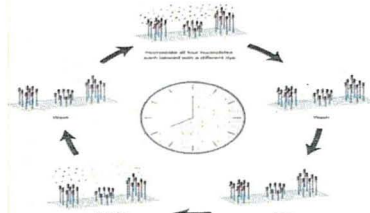
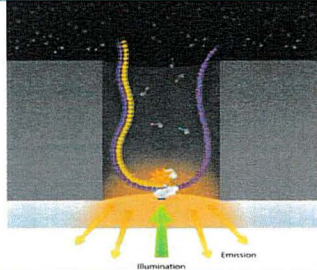
Le séquençage consiste à décoder linéairement les nucléotides de fragments d'ADN. Son historique remonte à 1977 grâce à Sanger et Gilbert qui ont tous les deux développé deux techniques de séquençage totalement différentes (Sanger et al., 1977). La méthode de Sanger a été la plus rapidement intégrée et a donné naissance à la première génération de séquenceur automatisé en 1980. Cette technologie représente aujourd'hui la base de toutes les autres technologies de séquençage. Elle a, d'ailleurs, permis de décrypter plusieurs génomes, dont le génome humain (« *Human Genome Project* ») (Collins et al., 2003, 1998). Toutefois, en 2005, il y a eu une explosion des nouvelles technologies de séquençage due à la demande scientifique. Cette nouvelle vague de séquenceurs est connue sous le nom de « *Next generation sequencing (NGS)* » et représente la 2<sup>ième</sup> génération de séquenceurs (Morozova et al., 2009; Ozsolak and Milos, 2011). Parmi ces technologies, trois ont été commercialisées simultanément et représentent aujourd'hui l'ensemble des analyses de séquençage : SOLiD (Life Technology), 454 Sequencing (Roche) et Illumina (Solexa/Illumina) (Corporation, 2015; Inc., n.d.). Les trois technologies dominantes se démarquent les unes des autres par leur chimie (Annexe III, Annexe IV, Figure 12). Elles se décomposent cependant toutes en quatre étapes principales : la préparation des banques d'ADN qui passe par une étape d'amplification par PCR, le séquençage, la prise en charge d'image après chaque étape de séquençage afin de déterminer le nucléotide puis l'analyse des données. Depuis 2010, ces technologies continuent à se sophistiquer et on voit apparaître petit à petit la 3<sup>ième</sup> génération de séquenceurs. Cette nouvelle génération est

capable de séquencer les molécules d'ADN ou d'ARN directement sur une molécule d'ADN sans amplification préalable. Il y a trois technologies naissantes : Technologies du nanopore, de StarLigth et Pacific Bioscience.

## 1.4.2 Les trois générations de séquençage

Comme nous avons mentionné précédemment, l'évolution du séquençage est très rapide et nous sommes actuellement à la troisième génération. Dans le tableau suivant nous avons présentés les caractéristiques des différentes générations.

Tableau 5 : Propriétés principales des différentes plateformes de séquençage (Schadt et al., 2010)

	1ère génération (FGS)	2ème Génération (SGS)	3ème génération (TGS)
<b>Plateformes</b>	Méthode de Sanger et la méthode de Maxam et Gilbert	Illumina, SOLiD et 454 Pyroséquençage	Nanopore, StartLight Pacifica BioScience et HeliScope
<b>Technologie</b>	SBS ou dégradation chimique + gel 	SBS « wash and scan » 	Inspection directe de la molécule d'ADN 
<b>Résolution</b>	Moyenne	Moyenne	Élevée
<b>Précision de la séquence lue</b>	Haute	Haute	Modérée
<b>Taille des séquences</b>	800/1000 ob	50-200 pb	1000 + pb
<b>Volume de donnée</b>	Bas	Haut	Modéré
<b>Temps de séquençage</b>	Heures	Jours	Heures
<b>PCR requise</b>	Non	Oui	Non
<b>Analyse des données</b>	Facile	Complexe	Complexe
<b>Cout / base</b>	Élevé	Bas	Modéré/bas
<b>Cout / séquençage</b>	Bas	Élevé	Bas

SBS : séquençage par synthèse ; « wash and scan » : lavage et détection



### 1.4.3 La chimie du séquençage : le modèle d'Illumina

Les technologies actuelles se base sur la chimie proposée par Sanger. Cette dernière utilise des « *dideoxynucleotides (ddNTP)* » en faible quantité et des « *desoxynucléotides (dNTP)* » normaux. Les ddNTP sont des bases dont l'un des groupements OH a été remplacé par un hydrogène empêchant ainsi la synthèse continue de l'ADN par la polymérase. Lors de l'amplification d'un brin d'ADN, les ddNTP vont entrer en compétition avec les dNTP, stoppant aléatoirement l'amplification, formant ainsi des fragments d'ADN de toutes tailles.

Le séquençage utilisé par Illumina est une variante du séquençage de Sanger appelé « *cycle de terminaison réversible (CRT)* ». Elle se base aussi sur l'utilisation de ddNTP mais ceux-ci sont fluorescents leur incorporation est réversible. Les étapes de séquençage sont décrites ci-dessous (les numéros devant chaque étape font référence aux numéros sur la Fig 12) :

**1) Banque d'ADN** : Le principe de cette étape est de créer des fragments « *ADN complémentaire primaire (ADN<sub>cp</sub>)* » de même taille utilisant des dNTPs. Ceci peut être fait à partir d'échantillon d'ADN ou d'un ADN<sub>c</sub> provenant d'une rétro-transcription. La dernière base de chaque fragment est phosphorylée afin de permettre la fixation d'un adaptateur spécifique (Fig. 12-d).

**2) Amplification clonale** : L'amplification clonale se caractérise par la formation d'ADN double brin en grande quantité. Cette étape se fait sur une phase solide contenant des séquences reconnaissant l'adaptateur fixé sur les fragments (étape 1). Ceux-ci permettent à l'ADN<sub>cp</sub> de se fixer à la phase solide (Fig. 12-e). L'amplification de l'ADN se fait avec l'incorporation de dNTP. On obtient ainsi l'« *ADN complémentaire second (ADN<sub>cs</sub>)* » (Fig. 12-f-i). Finalement, l'ADN<sub>cs</sub> fixé sur la phase solide, par l'amorce spécifique, sur le bout 5' est éliminé ne laissant plus que l'ADN<sub>cs</sub> fixé par le 3' (Fig. 12-k).

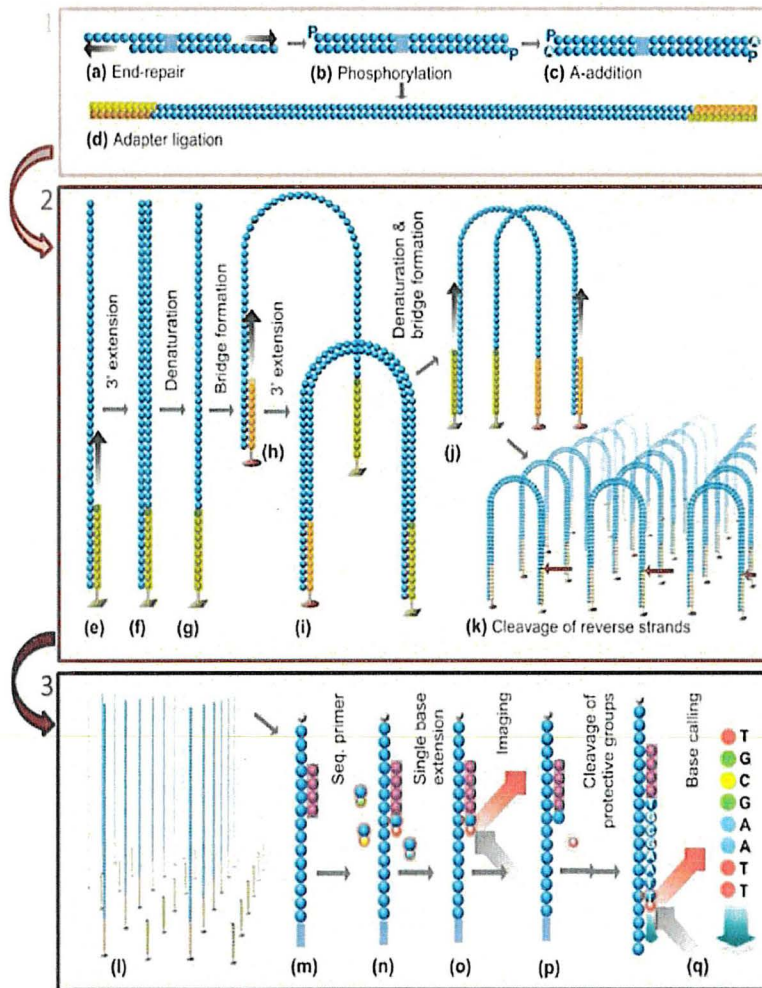


Figure 12 : Étapes de la chimie de séquençage de Illumina : 1) Préparation des banques d'ADN, 2) Amplification clonale et 3) Etape de séquençage.

**3) Séquençage :** Une amorce spécifique vient se fixer pour commencer l'élongation du brin d'ADNcs (Figure 12-m). L'élongation va se faire en présence de ddNTP. Le premier ddNTP va se fixer, stoppant l'incorporation de la base suivante. Ensuite un rayon lumineux va exciter le fluorophore porté par le ddNTP (Fig. 12-o), qui va émettre une fluorescence détectée par un spectrophotomètre. Ensuite le fluorophore est éliminé (clivé) (Fig 12-p) libérant l'espace pour que la base complémentaire suivante (ddNTP) puisse se fixer (Fig. 12-q). À son tour la base suivante va réaliser le même processus. On obtient ainsi la fluorescence des bases incorporées les unes après les autres. Cette fluorescence est détectée et enregistrée par un ordinateur (tout le processus est automatisé). La fluorescence donne l'identification de la base incorporée et permet donc de connaître l'alignement des bases des fragments d'ADN étudiés. Les trois étapes décrites précédemment se font pour tous les brins d'ADNcs parallèlement.

#### 1.4.4 Le séquençage et les analyses bio-informatiques.

A l'origine, le séquençage était utilisé pour la génomique (étude du génome). Les technologies se sont toutefois vite adaptées et des nouvelles applications sont apparues. En fonction des molécules séquencées, les analyses ne sont pas les mêmes (Fig. 13).

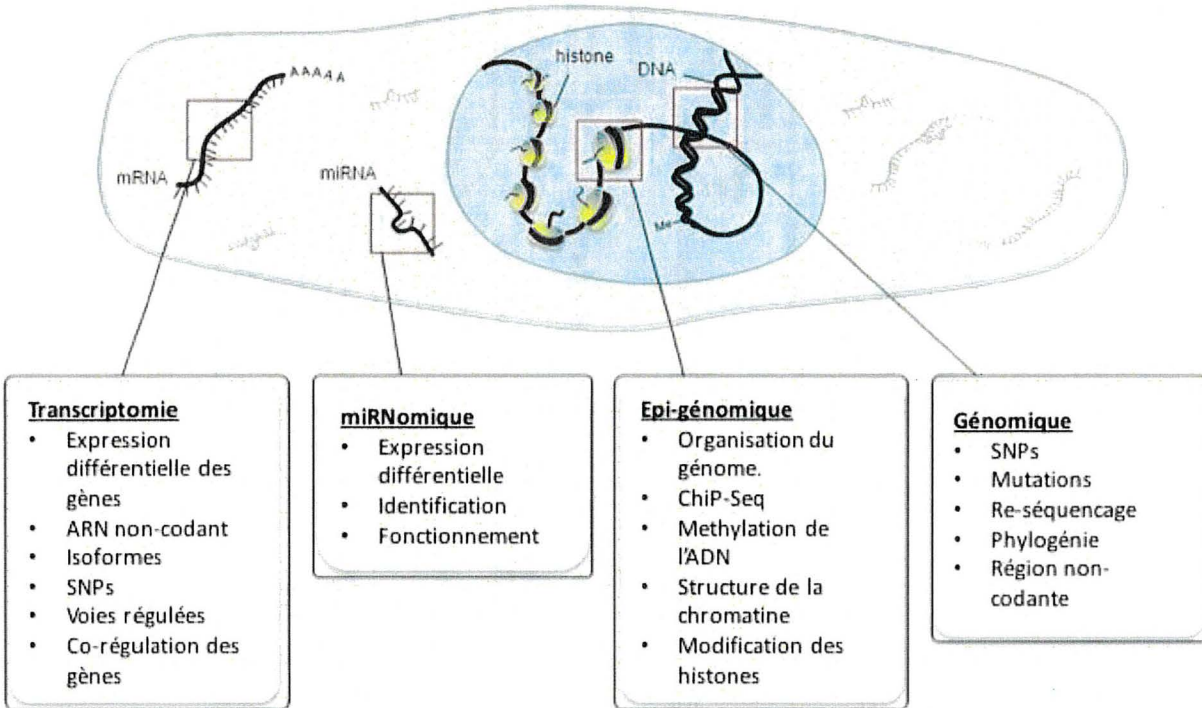


Figure 13 : Différentes applications des NGS en fonction de la molécule cible.

Les NGS se sont adaptées afin de pouvoir étudier l'organisation du génome, les modifications des histones, les relations nucléotides - protéines, protéines-ligand, donnant naissance à l'épi-génomique. Par ailleurs, la communauté scientifique a découvert que les micro ARN, les ARN d'interférence ou encore l'ARN connu sous le nom de « junk RNA » avaient un rôle primordial pour le bon fonctionnement cellulaire. Ces découvertes ont boosté l'adaptation des technologies afin de cibler ces molécules et étudier leur fonctionnement, leur rôle et leur expression. Les NGS permettent actuellement l'étude des transcriptome (transcriptomique). Le « séquençage de l'ARN (RNA-seq) » permet l'analyse des régions ayant de fortes homologies (des séquences répétées par exemple), des SNPs, des profils d'épissage alternatif, l'étude des isoformes de protéines, etc. Enfin, le RNA-Seq est principalement utilisé pour étudier l'expression différentielle de transcrits dans différents tissus exposés ou non à différents traitements.



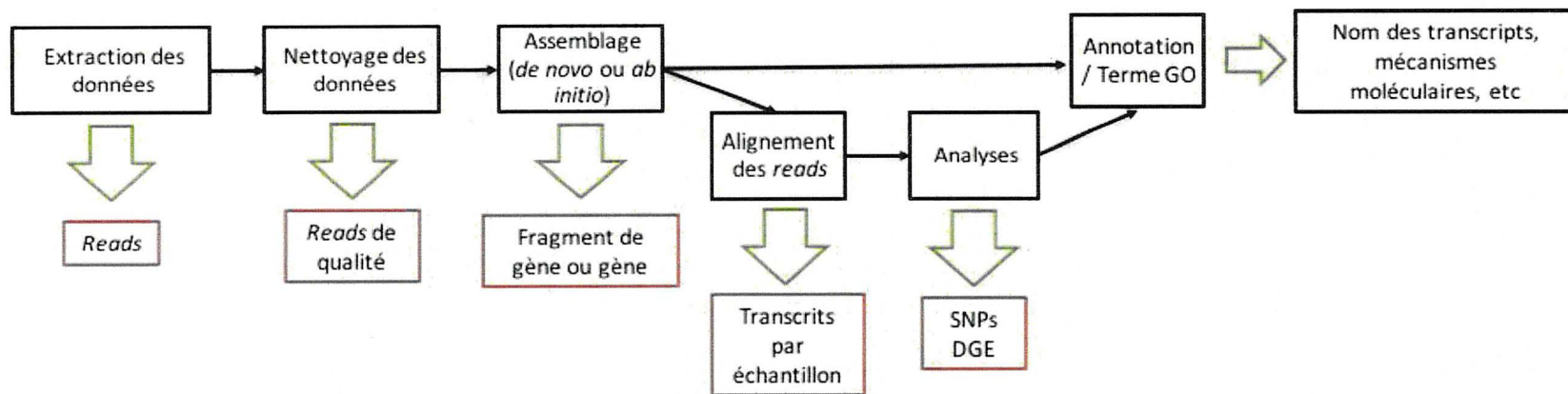
Ces technologies permettent ainsi d'obtenir la composition en acides aminés de millions de molécules. Cependant, l'énorme quantité de données générées demande des outils informatiques et bio-informatiques et des machines puissantes et fonctionnelles qui puissent traiter toutes les données (Goncalves et al., 2011; Mardis, 2008; Wang et al., 2009).

Il existe de nombreux programmes, scripts et algorithmes (voir le document de Alamancos *et al*, 2014) pour analyser les données (depuis le nettoyage à l'annotation des données), que ce soit pour Mac Os, Linux ou Windows. Chaque programme possède ses caractéristiques. Ils sont bien détaillés sur le net et les analyses bioinformatiques sont globalement les mêmes (voir Fig. 14).

Une fois le séquençage fait, les courtes séquences résultantes, connues sous le nom de *reads*, sont nettoyées. Le nettoyage consiste à éliminer les *reads* de faible qualité et de petite taille, les adaptateurs, les amorces et les queues polyA (Goncalves et al. 2011). Une fois que les *reads* sont propres, ils sont assemblés pour produire des « contigs » ou « transcrits ». Il existe deux approches d'assemblage que ce soit pour le séquençage d'ADN ou d'ARN : l'approche *ab initio* et l'approche *de novo*. L'approche *ab initio* se base sur l'assemblage des transcrits ou contigs en utilisant un génome ou transcriptome préalablement séquencé et connu tandis que l'approche *de novo* se base sur l'assemblage des transcrits sans aucune référence. Cette dernière approche est très utile dans le cadre des études sur des organismes non modèles dont les génomes ou transcriptomes ne sont pas connus (Wang et al., 2009).

Une fois que le génome ou le transcriptome est assemblé, il y a l'alignement ou « *le mapping* » qui permet de comparer les transcrits au génome/transcriptome de référence ou au génome/transcriptome assemblé *de novo*. Ceci permet de mettre en avant les gènes présents dans les échantillons, les mutations, les SNP, ou faire tout autre type d'analyse.

Les contigs sont généralement annotés et des analyses plus approfondies sont faites *via* l'utilisation de programmes comme « *Gene Ontologie (GO)* », BLAST-NCBI, KEGG, pour identifier précisément le nom des gènes, leurs fonctions moléculaires, les mécanismes dans lesquels ils sont impliqués et les protéines qui en découlent (Martin and Wang, 2011).



**Figure 14 : Processus des analyses bio-informatiques depuis l'extraction des données (ou reads) jusqu'à l'annotation du transcriptome ou des transcripts (modifié de Martin and Wang, 2011 et Wolf, 2013).**

#### 1.4.5 La transcriptomie pour l'étude des bivalves

La première utilisation de séquençage avec un bivalve a été décrite par Craft et ses collaborateurs (2010). Depuis, avec les technologies telles que le RNA-seq, le nombre de séquences de bivalves ne cessent d'augmenter (Apeti et al., 2010; Balseiro et al., 2011; Montes et al., 2012; Venier et al., 2011). Actuellement, le génome entier de *C. gigas* a été séquencé et publié (Zhang et al., 2012). Les génomes de *P. fucata* et de *M. galloprovincialis* ont aussi été séquencés et annotés même s'ils restent quand même à un niveau « brouillon » (Takeuchi et al., 2012). Plusieurs transcriptomes sont disponibles pour *M. galloprovincialis* (Gerdol et al., 2014; Rosani et al., 2011), *B. azoricus* (Bettencourt et al., 2010), *Patinopecten yessoensis* (Hou et al., 2011), *R. philippinarum* (Milan et al., 2011), *Corbicula fluminea* (*C. fluminea*) (Chen et al., 2013) et *C. giga* (Gavery and Roberts, 2012; Zhao et al., 2012). Dans le cas de *Mytilus spp*, 358 « Short Read Archive (SRA) » (2017) sont disponibles incluant des séquences du corps entier de l'organisme, de certains tissus (glande digestive, hémocytes) ou encore de larve. Par ailleurs, une base de données a été créée pour *M. galloprovincialis* : Mytibase (Venier et al., 2009).

En plus de l'utilisation du séquençage pour caractériser les génomes, l'approche RNA-seq a été utilisée pour identifier les gènes impliqués dans les défenses immunitaires et les réponses face aux stress chez les bivalves. Le séquençage a été réalisé sur des hémocytes immuno-stimulés de *R. philippinarum* par Moreira et ses collaborateurs (Moreira et al., 2012).

Un total de 51 265 séquences a été obtenu et a révélé des membres potentiels de plusieurs processus immunitaires tels que l'apoptose, la voie des récepteurs Toll et la cascade du système complémentaire. Cette technologie a aussi été utilisée pour évaluer les impacts de la contamination sur le système immunitaire. Par exemple, des gènes impliqués dans la détoxification du Cd *via* l'induction de ROS ont été mis en avant chez *Sinonovacula constricta*.

Une autre étude a été faite sur la glande digestive de *C. farreri* exposée au Cd, un total de 3800 gènes a été induit par le Cd, incluant des métallothionéines, des transporteurs de métaux divalents, des protéines jouant un rôle dans la tolérance aux métaux. Dans une autre étude, plusieurs domaines C1q ont été identifiés après une exposition au cuivre. Ces mêmes gènes avaient déjà été identifiés comme ayant un rôle essentiel dans la défense immunitaire contre les pathogènes et les métaux (Liu et al., 2014). Dans cette même étude, différentes voies moléculaires ont aussi été modifiées par le métal, comme la voie moléculaire de biosynthèse d'aminoacyl-tRNA qui est responsable de la synthèse des protéines, ou encore la voie moléculaire de réparation à l'ADN et du stress oxydant (Pytharopoulou et al., 2013; Villela et al., 2006). En résumé, le RNA-seq permet de mieux comprendre et de compléter les processus impliqués lors d'un stress ou d'une infection. En effet, le séquençage du transcriptome a permis de mettre en avant de nombreux processus tels que les voies TLRs, NF- $\kappa$ B, l'apoptose, le stress oxydatif. Plusieurs transcrits en relation avec l'immunité ont été identifiés, chez d'autres bivalves comme *M. edulis*, tels qu'un répertoire complexe de PRRs, des cytokines dont des TNF et des membres des systèmes apoptotiques et autophagiques (Ertl et al., 2016; Philipp et al., 2012). Néanmoins, à ce jour, il n'existe pas d'études au niveau transcriptomique, qui mettent en avant les effets des métaux sur cette espèce.



*La moule bleue, un organisme modèle, est exposée aux contaminants présents dans son écosystème. Parmi ces contaminants, nous pouvons retrouver le Cd, un métal lourdement toxique, qui affecte les bivalves et modifie leurs capacités immunitaire. En parallèle, la science ne cesse d'évoluer et de nouvelles technologies, telles que le séquençage du transcriptome, permettent aujourd'hui d'aller chercher plus loin dans les voies moléculaires et cellulaires afin de comprendre des mécanismes encore inconnus. C'est en prenant en compte ces trois grands sujets que nous avons émis l'hypothèse présentée en suivant.*

## 2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Dans le cadre de ce projet, nous avons émis l'hypothèse que le Cd pouvait moduler l'expression des gènes impliqués dans le système immunitaire de la moule bleue, *M. edulis*. Dans notre étude nous avons couplé la toxicologie traditionnelle (modèle *in vitro* et exposition aux contaminants) avec les nouvelles technologies de séquençage (RNA-seq et l'expression différentielle des gènes) afin de mettre en place une étude mécanistique. Deux principaux objectifs ont donc été suivis.

Objectif 1 : Mettre en place un modèle *in vitro* permettant d'étudier les effets du Cd sur les fonctions cellulaires et moléculaires des hémocytes de la moule bleue en utilisant une approche transcriptomique.

Afin de réaliser cet objectif, nous avons exposé *in vitro* des hémocytes de moule à une gamme de concentrations de Cd afin de cibler la concentration de Cd modifiant les capacités cellulaires des hémocytes. L'ARN des hémocytes exposés a été séquencé par le Centre d'Innovation Génome Québec de l'Université McGill avec la plateforme Illumina HiSeq 2000. Ces séquences nous ont permis de construire un transcriptome *de novo*, de faire une étude d'« *expression différentielle des gènes (DGE)* » et de comparer les gènes induits chez les hémocytes exposés au Cd. La mise en place de ce modèle et la transcriptomie ont permis de mettre en évidence la modification de certains gènes fondamentaux pour le bon fonctionnement du système immunitaire. Les résultats obtenus ont été publiés dans *Fish & Shellfish Immunology*.

Objectif 2 : Identifier et valider des marqueurs moléculaires qui caractériseraient les effets du Cd sur le système immunitaire de la moule.

Le séquençage de l'ARN et l'analyse DGE permettent d'obtenir une grande banque de données des gènes potentiellement modulés par le Cd. Un avantage mais aussi désavantage de cette technologie est qu'elle offre un panel énorme de gènes pouvant être utilisés comme marqueurs. Dans cette partie du travail, nous avons étudié les voies moléculaires associées aux effets du Cd et identifié des marqueurs moléculaires putatifs susceptibles d'être utilisés comme signature moléculaire pour surveiller la toxicité du Cd dans écosystèmes marins. Plus précisément, nous avons identifié 12 transcrits dont l'expression a été modulée suite à l'exposition au Cd, validé leur expression par RT-qPCR et corrélé leurs niveaux d'expression avec la phagocytose et la viabilité cellulaire. Les résultats de cet article ont été soumis pour publication dans *Aquatic Toxicology*

### 3 RÉFÉRENCES

- Aarab, N., 2004. Les biomarqueurs chez les poissons et les bivalves : De l'exposition à l'effet et du laboratoire au terrain. Université de Bordeaux 1.
- Abboud, P., 2012. Effet du calcium, plomb et cuivre sur la bioaccumulation du cadmium et la production des phytochélatines par *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Achard-Joris, M., 2005. Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant.
- Adriano, D.C., 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals., 2nd ed. New York : Springer, c2001., New York.
- Allam, B., Pales Espinosa, E., 2016. Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place? *Fish Shellfish Immunol.* 53, 4–12. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.fsi.2016.03.037
- Allam, B., Raftos, D., 2015. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 121–136. doi://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.005
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Charbonnier, L., Mesnil, A., Rainbow, P.S., Wang, W.-X., Bendell, L.I., 2008. Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from Western Europe and Asia. *Food Addit. Contam. Part B Surveill. Commun.* 46, 131–139.
- Aparicio-González, A., Duarte, C.M., Tovar-Sánchez, A., 2012. Trace metals in deep ocean waters: A review. *J. Mar. Syst.* 100–101, 26–33. doi:10.1016/j.jmarsys.2012.03.008
- Apeti, D.A.A., Lauenstein, G.G.G., Christensen, J.D.D., Kimbrough, K., Johnson, W.E.E., Kennedy, M., Grant, K.G.G., 2010. A historical assessment of coastal contamination in Birch Harbor, Maine based on the analysis of mussels collected in the 1940s and the Mussel Watch Program. *Mar Pollut Bull* 60, 732–742. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.11.021
- Araya, M.T., Markham, F., Mateo, D.R., McKenna, P., Johnson, G.R., Berthe, F.C.J., Siah, A., 2010. Identification and expression of immune-related genes in hemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*, challenged with *Vibrio splendidus*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 557–564. doi:10.1016/j.fsi.2010.05.017 [doi]



- Asokan, R., Arumugam, M., Mullainadhan, P., 1997. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel - *Perna viridis* Linnaeus, DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY. doi:10.1016/S0145-305X(97)00004-9
- Association International Cadmium, 2009. International Cadmium Association [WWW Document]. ICdA, Belgique. URL <http://www.cadmium.org/home> (accessed 1.18.18).
- Aucoin, F., Doiron, S., Nadeau, M., n.d. Guide d'échantillonnage et d'identification des larves d'espèces à intérêt maricole. Québec.
- Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D., n.d. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Mar. Environ. Res. 54, 585–9.
- Balseiro, P., Falc 3, A., Romero, A., Dios, S., Mart 3-nez-L 3pez, A., Figueras, A., Estepa, A., Novoa, B., 2011. Mytilus galloprovincialis myticin C: a chemotactic molecule with antiviral activity and immunoregulatory properties. PLoS One 6. doi:10.1371/journal.pone.0023140
- Barcia, R., Ramos-Mart 3nez, J.I., 2011. Stress-based modulation of the immune response in molluscan hemocytes: a two-receptor model. ISJ 8.
- Beiras, R., Albentosa, M., 2004. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; implications for the implementation of seawater quality criteria. Aquaculture 230, 205–213. doi://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00432-0
- Bendell, L.I., 2009. Survey of levels of cadmium in oysters, mussels, clams and scallops from the Pacific Northwest coast of Canada. Food Addit. Contam. Part B Surveill. Commun. 2, 131–139.
- Bertin, G., Averbeck, D., D., A., 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). Biochimie 88, 1549–1559. doi:10.1016/j.biochi.2006.10.001
- Bessi, H., ElAlami, M., 2009. Les bio-essais dans l' 3valuation d'impact des polluants sur les  3cosyst 3mes dulc 3aquicoles. Les Technol. Lab. 4, 16–22.
- Bettencourt, R., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, P., Afonso, M., Shank, T., Santos, R.S., 2010. High-throughput sequencing and analysis of the gill tissue transcriptome from the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. BMC Genomics 11. doi:10.1186/1471-2164-11-559

Blanchette, C.D., Woo, Y.-H., Thomas, C., Shen, N., Sulchek, T.A., Hiddessen, A.L., 2009. Decoupling Internalization, Acidification and Phagosomal-Endosomal/lysosomal Fusion during Phagocytosis of InIA Coated Beads in Epithelial Cells. *PLoS One* 4, e6056.

Blandin, P., 1986. Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bull. d'écologie* Tome 17.

Bohlson, S.S., Fraser, D.A., Tenner, A.J., 2007. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol. Immunol.* 44, 33–43. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.molimm.2006.06.021

Boutet, I., Arnaud Tanguy, A., Sabrina Rousseau, A., Michel Auffret, A., Dario Moraga, A., Tanguy, A., Rousseau, S., Auffret, M., Moraga, D., 2003. Molecular Identification and Expression of Heat Shock Cognate 70 (hsc70) and Heat Shock Protein 70 (hsp70) Genes in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperones* VO - 8 76. doi:10.1379/1466-1268(2003)8<76:MIAEOH>2.0.CO;2

Brian A. Whitton, author, 1994. *Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants*. D. J. H. Phillips P. S. Rainbow. *J. Appl. Ecol.* VO - 31. doi:10.2307/2404456

Cajaraville, M.P., Olabarrieta, I., Marigomez, I., 1996. In Vitro Activities in Mussel Hemocytes as Biomarkers of Environmental Quality: A Case Study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 253–260. doi:10.1006/eesa.1996.0108

Callaway, R., Shinn, A.P., Grenfell, S.E., Bron, J.E., Burnell, G., Cook, E.J., Crumlish, M., Culloty, S., Davidson, K., Ellis, R.P., Flynn, K.J., Fox, C., Green, D.M., Hays, G.C., Hughes, A.D., Johnston, E., Lowe, C.D., Lupatsch, I., Malham, S., Mendzil, A.F., Nickell, T., Pickerell, T., Rowley, A.F., Stanley, M.S., Tocher, D.R., Turnbull, J.F., Webb, G., Wootton, E., Shields, R.J., 2012. Review of climate change impacts on marine aquaculture in the UK and Ireland. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 22, 389–421. doi:10.1002/aqc.2247

Canada, M. of J.-E., 2013. *Canadian Environmental Protection Act*. doi://laws-lois.justice.gc.ca

Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Citterio, B., Pruzzo, C., Gallo, G., 2003. Tyrosine kinase-mediated cell signalling in the activation of *Mytilus* hemocytes: possible role of STAT-like proteins. *Biol. Cell* 95, 603–613. doi:10.1016/j.biocel.2003.09.006

Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Lorusso, L.C., Pruzzo, C., Gallo, G., 2006. Cell signalling in the immune response of mussel hemocytes. *Invertebr. Surviv. J.* 3, 40–49.

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002. Bacteria– hemocyte Interactions and Phagocytosis in Marine Bivalves. *Microsc. Res. Tech* 57, 469–476. doi:10.1002/jemt.10100

Cavallasca, J., 2017. Autophagie : quand le stress cellulaire modéré aide à vivre mieux et plus longtemps - work for human longevity [WWW Document]. URL <http://www.longlonglife.org/fr/uncategorized-fr/autophagie-quand-le-stress-cellulaire-modere-aide-vivre-mieux-et-plus-longtemps/> (accessed 1.20.18).

Cellura, C., Toubiana, M., Parrinello, N., Roch, P., 2007. 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. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.fsi.2006.06.007

Cellura, C., Toubiana, M., Parrinello, N., Roch, P., 2006. 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. doi://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2005.12.009

Chen, H., Zha, J., Liang, X., Bu, J., Wang, M., Wang, Z., 2013. Sequencing and De Novo Assembly of the Asian Clam (*Corbicula fluminea*) Transcriptome Using the Illumina GAIIx Method. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0079516

Cheng, T.C., 1984. A Classification of Molluscan Hemocytes Based on Functional Evidences, in: *Invertebrate Blood*. Springer US, Boston, MA, pp. 111–146. doi:10.1007/978-1-4684-4766-8\_5

Cheng, T.C., Sullivan, J.T., 1984. Immunology and pathology: Effects of heavy metals on phagocytosis by Molluscan hemocytes. *Mar. Environ. Res.* 14, 305–315. doi:10.1016/0141-1136(84)90084-9

Choong, G., Liu, Y., Templeton, D.M., 2014. Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 211, 54–65. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.cbi.2014.01.007

Cima, F., Matozzo, V., Marin, M.G., Ballarin, L., 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish Shellfish Immunol.* doi:10.1006/fsim.2000.0282

Collins, F.S., Morgan, M., Patrinos, A., 2003. The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology. *Science* (80-. ). 300, 286–290.



Collins, F.S., Patrinos, A., Jordan, E., Chakravarti, A., Gesteland, R., Walters, L., groups, the members of the D.O.E. and N.I.H. planning, 1998. New Goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. *Science* (80-. ). 282, 682–689. doi:10.1126/science.282.5389.682

Corporation, R.D., 2015. The Technology [WWW Document]. URL <http://454.com/products/technology.asp>

Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A.R., Munters, E., Artois, T.J., Nawrot, T., Vangronsveld, J., Smeets, K., 2010. Cadmium stress: An oxidative challenge. *BioMetals*. doi:10.1007/s10534-010-9329-x

Damy, P.-C., 2011. Synthèse des connaissances sur l'origine et la disponibilité du cadmium dans les eaux continentale. l'Onema, Agences de l'eau et L'OIEau, Paris, Agro Paris Tech.

DEC, 2001. Establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC - Decision No. 2455 / 2001 / EC of The European Parliament and of the Council.

Delahaut, V., 2012. Development of a Challenge Test for the Blue Mussel, *Mytilus edulis*. Universiteit Gent.

Di Poi, C., Evariste, L., Serpentine, A., Halm-Lemeille, M.-P., Lebel, J.-M., Costil, K., 2014. Toxicity of five antidepressant drugs on embryo–larval development and metamorphosis success in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 13302–13314.

Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goïc, N., Lambert, C., Volety, A.K., Soudant, P., 2012. Reactive Oxygen Species in Unstimulated Hemocytes of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: A Mitochondrial Involvement. *PLoS One* 7, e46594.

Dyachuk, V.A., 2016. Hematopoiesis in Bivalvia larvae: Cellular origin, differentiation of hemocytes, and neoplasia. *Dev. Comp. Immunol.* 65, 253–257. doi:10.1016/j.dci.2016.07.019

Ellis, R.P., Parry, H., Spicer, J.I., Hutchinson, T.H., Pipe, R.K., Widdicombe, S., 2011. Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 1209–1222. doi://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.03.017

Elston, R., Leibovitz, L., 1980. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37, 964–978.

EPA, 2012. Toxic Chemical Release Inventory Reporting Forms and Instructions - Section 313 of the Emergency Planning and Community Right-to-Know Act (Title III of the Superfund Amendments and Reauthorization Act of 1986).

- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 529–539.
- Ertl, N.G., O'Connor, W.A., Papanicolaou, A., Wiegand, A.N., Elizur, A., 2016. Transcriptome Analysis of the Sydney Rock Oyster, *Saccostrea glomerata*: Insights into Molluscan Immunity. *PLoS One* 11, e0156649.
- Ettajani, H., Amiard, J.C., 1995. Biodisponibilité de quelques métaux fixés sur les matières en suspension (MES) en milieu estuarien. *Hydroécol. Appl.* 7, 75–89.
- Fabbri, E., Valbonesi, P., Franzellitti, S., 2008. HSP expression in bivalves . *ISJ* 5.
- FAO, 2017. Cultured Aquatic Species Information Programme: *Mytilus edulis*. <br>. FAO Fish. Aquac. Dep.
- FAO, 2004. Cultured Aquatic Species Information Programme *Mytilus edulis*. Cultured Aquatic Species Fact Sheets [WWW Document]. Département des pêches l'aquaculture la FAO [en ligne]. URL <http://www.fao.org/fi/common/format/popUpCitation.jsp?type=citation> (accessed 1.17.18).
- Fisheries and Oceans, 2003. Profile of the Blue Mussel (*Mytilus edulis*). Moncton, NB.
- Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Brousseau, P., 2000. Phagocytosis as a Biomarker of Immunotoxicity in Wildlife Species Exposed to Environmental Xenobiotics. *Am. Zool.* 40, 412–420.
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y., Brousseau, P., 2001. Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161, 201–211. doi:10.1016/S0300-483X(00)00387-5
- Gagnaire, B., 2005. Etude des effets de polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2004. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 501–512. doi:10.1016/j.fsi.2003.08.007
- 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. *Sci. Rep.* 6, 26853.

- Gavery, M.R., Roberts, S.B., 2012. Characterizing short read sequencing for gene discovery and RNA-Seq analysis in *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 7. doi:10.1016/j.cbd.2011.12.003
- Geffard, O., Budzinski, H., His, E., 2002. The Effects of Elutriates from PAH and Heavy Metal Polluted Sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) Embryogenesis, Larval Growth and Bioaccumulation by the Larvae of Pollutants from Sedimentary Origin. *Ecotoxicology* 11, 403–416. doi:10.1023/A:1021024415695
- Geffard, O., Budzinski, H., LeMenach, K., 2004. Chemical and ecotoxicological characterization of the “Erika” petroleum: bio-tests applied to petroleum water-accommodated fractions and natural contaminated samples. *Aquat. Living Resour.* 17, 289–296.
- Gerdol, M., Moro, G., Manfrin, C., Milandri, A., Riccardi, E., Beran, A., Venier, P., Pallavicini, A., 2014. RNA sequencing and de novo assembly of the digestive gland transcriptome in *Mytilus galloprovincialis* fed with toxinogenic and non-toxic strains of *Alexandrium minutum*. *BMC Res Notes* 7. doi:10.1186/1756-0500-7-722
- Gerdol, M., Venier, P., 2015. An updated molecular basis for mussel immunity. *Fish Shellfish Immunol.* doi://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.013
- Gestal, C., Pallavicini, A., Venier, P., Novoa, B., Figueras, A., 2010. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 926–934. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.dci.2010.02.012
- Gestal, C., Roch, P., Renault, T., Pallavicini, A., Paillard, C., Novoa, B., Oubella, R., Venier, P., Figueras, A., 2008. Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics. *Rev Fish Sci* 16, 131–154. doi:10.1080/10641260802325518
- Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, M. P., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol. Vitro.* 17, 539. doi:10.1016/S0887-2333(03)00093-6
- Goncalves, A., Tikhonov, A., Brazma, A., Kapushesky, M., 2011. A pipeline for RNA-seq data processing and quality assessment. *Bioinformatics* 27, 867–869. doi:10.1093/bioinformatics/btr012; 10.1093/bioinformatics/btr012
- Goodwin, S., McPherson, J.D., McCombie, W.R., 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* 17, 333–351. doi:10.1038/nrg.2016.49



Gouvernement du Canada, P. et O.C., 2015. Moules d'élevage [WWW Document]. URL <http://www.dfo-mpo.gc.ca/aquaculture/sector-secteur/species-especes/mussels-moules-fra.htm>

Guo, X., He, Y., Zhang, L., Lelong, C., Jouaux, A., 2015. Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 107–119. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.fsi.2015.05.018

Hartwig, A., 2001. Zinc Finger Proteins as Potential Targets for Toxic Metal Ions: Differential Effects on Structure and Function. *Antioxid. Redox Signal.* 3, 625–634. doi:10.1089/15230860152542970

He, P., Lu, Y., Liang, Y., Chen, B., Wu, M., Li, S., He, G., Jin, T., 2013. Exposure assessment of dietary cadmium: findings from shanghaiense over 40 years, China. *BMC Public Health* 13, 1–11. doi:10.1186/1471-2458-13-590

Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 293, 249–265. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/S0022-0981(03)00235-1

Helm, M.M., Bourne, N., 2006. *Ecloserie de bivalves*. Rome.

Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A.J., Cohen, A.H., Terwilliger, D.P., Buckley, K.M., Brockton, V., Nair, S. V, Berney, K., Fugmann, S.D., Anderson, M.K., Pancer, Z., Cameron, R.A., Smith, L.C., Rast, J.P., 2006. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev. Biol.* 300, 349–365. doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.065

Hou, R., Bao, Z., Wang, S., Su, H., Li, Y., Du, H., Hu, J., Hu, X., 2011. Transcriptome sequencing and de novo analysis for *Yesso scallop* (*Patinopecten yessoensis*) using 454 GS FLX. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0021560

Inc., T.F.S., n.d. SOLiDR Next Generation Sequencing Chemistry [WWW Document]. URL <http://www.lifetechnologies.com/ca/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/solid-next-generation-sequencing/solid-next-generation-sequencing-systems-reagents-accessories/solid-next-generation-sequencing-chemistry.html#>

Jacobson, K.B., Turner, J.E., 1980. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology* 16, 1–37. doi:10.1016/0300-483X(80)90107-9

Jiang, J., Zhou, Z., Dong, Y., Sun, H., Chen, Z., Yang, A., Gao, S., Wang, B., Jiang, B., Guan, X., 2014. Phenoloxidase from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*: cDNA cloning, expression

and substrate specificity analysis. *Fish Shellfish Immunol.* 36, 344–351. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.fsi.2013.12.001

Joseph, P., 2009. Review: Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 272–279. doi:10.1016/j.taap.2009.01.011

Kaviraj, A., Unlu, E., Gupta, A., El Nemr, A., 2014. Biomarkers of Environmental Pollutants. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–2. doi:10.1155/2014/806598

Kigerl, K.A., de, R.V., Dietrich, W.D., Popovich, P.G., Keane, R.W., 2014. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp. Neurol.* 258, 5–16. doi:10.1016/j.expneurol.2014.01.001

Kim, Y., Powell, E.N., Wade, T.L., Presley, B.J., 2008. Relationship of parasites and pathologies to contaminant body burden in sentinel bivalves: NOAA Status and Trends “Mussel Watch” Program. *Mar. Environ. Res.* doi:10.1016/j.marenvres.2007.09.003

Kimbrough, K.L., Johnson, W.E., Lauenstein, G.G., Christensen, J.D., Apeti, D.A., 2008. An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation’s Coastal Zone. <br> Silver Spring, MD. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 74.

Klaassen, C.D., Liu, J., Diwan, B.A., 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 215–220. doi:10.1016/j.taap.2009.03.026

Kothinti, R., Blodgett, A., Tabatabai, N.M., Petering, D.H., 2010. Zinc Finger Transcription Factor Zn3-Sp1 Reactions with Cd<sup>2+</sup>. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 405–412. doi:10.1021/tx900370u

Kumar, V., Abbas, A., Aster, J.C., 2015. Robbins & Cotran Patologia-bases patológicas das doenças, 9th ed. Elsevier Brasil.

Kumaresan, V., Harikrishnan, R., Arockiaraj, J., 2015. A potential Kazal-type serine protease inhibitor involves in kinetics of protease inhibition and bacteriostatic activity. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 430–438. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.fsi.2014.11.027

Le Foll, F., Rioult, D., Boussa, S., Pasquier, J., Dagher, Z., Leboulenger, F., 2010. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 372–386. doi://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.011

Levine, B., 2005. Eating oneself and uninvited guests: Autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 159.

- LingLing, W., LiMei, Q., Zhi, Z., LinSheng, S., 2013. Research progress on the mollusc immunity in China. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 2–10.
- Liu, H.-H., Xiang, L.-X., Shao, J.-Z., 2014. A novel C1q-domain-containing (C1qDC) protein from *Mytilus coruscus* with the transcriptional analysis against marine pathogens and heavy metals, *Developmental & Comparative Immunology*. doi:10.1016/j.dci.2013.11.009
- Liu, J., Qu, W., Kadiiska, M.B., 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 209–214. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.taap.2009.01.029
- Luna-González, A., Maeda-Martínez, A.N., Vargas-Albores, F., Ascencio-Valle, F., Robles-Mungaray, M., 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 275–282. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/S1050-4648(02)00165-1
- LvYun, Z., Li, N., Guan, Z., LiXin, X., JianZhong, S., 2013. Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 39–62.
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2663–2670. doi://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.10.009
- Malagoli, D., 2010. Cytokine network in invertebrates: the very next phase of comparative immunology. *Invertebr. Surviv. J.* 7, 146–148.
- Mardis, E.R., 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* 24, 133–141. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.tig.2007.12.007
- Martin, J.A., Wang, Z., 2011. Next-generation transcriptome assembly. *Nat. Rev. Genet.* 12, 671–682.
- Mateo, D., 2010. In vivo model of the response of soft-shell clam (*Mya arenaria*) haemocytes differentially by two strains of *Vibrio splendidus*. Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medecin (AVC), Charlottetown, Prince Edward Island, Canada.
- Matozzo, V., Marin, M.G., Cima, F., Ballarin, L., 2008. First evidence of cell division in circulating haemocytes from the Manila clam *Tapes philippinarum*. *Cell Biol. Int.* 32, 865–868. doi:10.1016/j.cellbi.2008.03.008



- McGettigan, P.A., 2013. Transcriptomics in the RNA-seq era. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 4–11.
- MESA, 2015. Molluscs of Australia [WWW Document]. Mar. Educ. Soc. Australas. URL [http://www.mesa.edu.au/molluscs/molluscs\\_01.asp](http://www.mesa.edu.au/molluscs/molluscs_01.asp) (accessed 2.14.17).
- Milan, M., Coppe, A., Reinhardt, R., Cancela, L.M., Leite, R.B., Saavedra, C., Ciofi, C., Chelazzi, G., Patarnello, T., Bortoluzzi, S., Bargelloni, L., 2011. Transcriptome sequencing and microarray development for the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: genomic tools for environmental monitoring. *BMC Genomics* 12. doi:10.1186/1471-2164-12-234
- Misra, U.K., Gawdi, G., Akabani, G., Pizzo, S.V., 2002. Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: The role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms. *Cell. Signal.* 14, 327–340. doi:10.1016/S0898-6568(01)00268-6
- Møhlenberg, F., Jensen, A., 1980. The ecotoxicology of cadmium in fresh and sea water and water pollution with cadmium in Denmark.
- Montes, M.O., Hanna, S.K., Lenihan, H.S., Keller, A.A., 2012. Uptake, accumulation, and biotransformation of metal oxide nanoparticles by a marine suspension-feeder. *J Hazard Mater* 225â€“6. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.05.009
- Moore, M.N., Viarengo, A., Donkin, P., Hawkins, A.J.S., 2007. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquat. Toxicol.* 84, 80–91. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.aquatox.2007.06.007
- Moreira, R., Balseiro, P., Planas, J. V, Fuste, B., Beltran, S., Novoa, B., Figueras, A., 2012. Transcriptomics of in vitro immune-stimulated hemocytes from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing. *PLoS One* 7, e35009. doi:10.1371/journal.pone.0035009
- Morin, A., 2002. Les Mollusques [WWW Document]. Univ. d'Ottawa. URL [http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/Notes/Les\\_Mollusques.htm](http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/Notes/Les_Mollusques.htm) (accessed 2.14.17).
- Morozova, O., Hirst, M., Marra, M.A., 2009. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 10, 135–151. doi:10.1146/annurev-genom-082908-145957; 10.1146/annurev-genom-082908-145957
- Muñoz, P., Meseguer, J., Esteban, M.Á., 2006. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 12–19. doi:10.1016/j.fsi.2005.02.002
- NatureWatch NZ, 2016. Blue Mussel (*Mytilus edulis*) . URL <http://naturewatch.org.nz>

- Nieboer, E., Richardson, D.H.S., 1980. The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. Ser. B, Chem. Phys.* 1, 3–26.
- Nonaka, M., 2011. The complement C3 protein family in invertebrates. *Invertebr. Surviv. J.* 8, 21–32.
- Olabarrieta, I., L’Azou, B., Yuric, S., Cambar, J., Cajaraville, M. P., 2001. In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicol. Vitr.* 15, 511–517. doi://dx.doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00056-X
- Olsen, Ø.M., Nilsen, I.W., Sletten, K., Myrnes, B., 2003. Multiple invertebrate lysozymes in blue mussel (*Mytilus edulis*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 136, 107. doi:10.1016/S1096-4959(03)00174-X
- Ozsolak, F., Milos, P.M., 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Genet.* 12, 87–98.
- Peakall, D., Burger, J., 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 110–121.
- Phagocytose, n.d. Maurice Ravel Cité Sc.
- Philipp, E.E.R., Kraemer, L., Melzner, F., Poustka, A.J., Thieme, S., Findeisen, U., Schreiber, S., Rosenstiel, P., 2012. Massively Parallel RNA Sequencing Identifies a Complex Immune Gene Repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS One* 7, 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0033091
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Thomas, M.E., Fossato, V.U., Pulsford, A.L., 1995. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. *Aquat. Toxicol.* 32, 59–73. doi://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(94)00076-3
- Prado-Alvarez, M., Rotllant, J., Gestal, C., Novoa, B., Figueras, A., 2009. Characterization of a C3 and a factor B-like in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 305–315. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.fsi.2008.11.015
- Pytharopoulou, S., Kournoutou, G.G., Leotsinidis, M., Georgiou, C.D., Kalpaxis, D.L., 2013. Cadmium versus copper toxicity: Insights from an integrated dissection of protein synthesis pathway in the digestive glands of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Hazard. Mater.* 260, 263–271. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.05.031

- Roberts, D., 2018. CABI, *Mytilus edulis* [WWW Document]. Invasive Species Compend. Wallingford, UK. URL [www.cabi.org/isc](http://www.cabi.org/isc) (accessed 1.16.18).
- Roberts, S., Gueguen, Y., de Lorgeril, J., Goetz, F., 2008. Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1099–1104. doi:10.1016/j.dci.2008.02.006
- Romero, A., Estévez-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.
- Romero, A., Novoa, B., Figueras, A., 2015. The complexity of apoptotic cell death in mollusks: An update. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 79–87. doi:10.1016/j.fsi.2015.03.038
- Rosani, U., Varotto, L., Rossi, A., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A., Pallavicini, A., Venier, P., 2011. Massively parallel amplicon sequencing reveals isotype-specific variability of antimicrobial peptide transcripts in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0026680
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467.
- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Senécal, 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. doi:10.1016/S0166-445X(01)00232-6
- Schadt, E.E., Turner, S., Kasarskis, A., 2010. A window into third-generation sequencing. *Hum. Mol. Genet.* 19, R227–R240.
- Sokolova, I.M., 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebr. Surviv. J.* 6, 49–58.
- 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. doi:10.1242/jeb.01152
- Song, X., Wang, H., Xin, L., Xu, J., Jia, Z., Wang, L., Song, L., 2016. The immunological capacity in the larvae of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 49, 461–469. doi://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.009
- Soudant, P., Chu E., F.-L., Volety, A., 2013. Host–parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, Perkinsus species. *J. Invertebr. Pathol.* doi:10.1016/j.jip.2013.06.001



- Stuart, L.M., Ezekowitz, R.A.B., 2005. Phagocytosis: Elegant Complexity. *Immunity* 22, 539–550. doi://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2005.05.002
- Sud, C.R.C.B., CRC Bretagne Sud, 2010. Mytiliculture [WWW Document]. CRC Bretagne Sud. URL <http://www.huitres-de-bretagne.com/mytiliculture> (accessed 2.13.17).
- Takeuchi, T., Kawashima, T., Koyanagi, R., Gyoja, F., Tanaka, M., Ikuta, T., Shoguchi, E., Fujiwara, M., Shinzato, C., Hisata, K., Fujie, M., Usami, T., Nagai, K., Maeyama, K., Okamoto, K., Aoki, H., Ishikawa, T., Masaoka, T., Fujiwara, A., Endo, K., Endo, H., Nagasawa, H., Kinoshita, S., Asakawa, S., Watabe, S., Satoh, N., 2012. Draft genome of the pearl oyster *Pinctada fucata*: a platform for understanding bivalve biology. *DNA Res* 19, 117–130. doi:10.1093/dnares/dss005
- Tanguy, M., 2013. Réponses physiologiques et variations du transcriptome hémocytaire de *Mytilus edulis* lors d'une infection par *Vibrio splendidus*.
- Thévenod, F., 2010. Catch me if you can! Novel aspects of cadmium transport in mammalian cells. *BioMetals* 23, 857–875. doi:10.1007/s10534-010-9309-1
- Thévenod, F., 2009. Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 221–239. doi:10.1016/j.taap.2009.01.013
- Thevenod, F., Friedmann, J.M., Katsen, A.D., Hauser, I.A., 2000. Up-regulation of Multidrug Resistance P-glycoprotein via Nuclear Factor- B Activation Protects Kidney Proximal Tubule Cells from Cadmium- and Reactive Oxygen Species-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 1887–1896. doi:10.1074/jbc.275.3.1887
- Tirapé, A., Bacque, C., Brizard, R., Vandenbulcke, F., Boulo, V., 2007. Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 859–873. doi:10.1016/j.dci.2007.01.005
- Venier, P., PittÃ, C., Bernante, F., Varotto, L., Nardi, B., Bovo, G., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A., Pallavicini, A., Lanfranchi, G., 2009. MytiBase: a knowledgebase of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences. *BMC Genomics* 10. doi:10.1186/1471-2164-10-72
- Venier, P., Varotto, L., Rosani, U., Millino, C., Celegato, B., Bernante, F., Lanfranchi, G., Novoa, B., Roch, P., Figueras, A., Pallavicini, A., 2011. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics* 12, 69–87. doi:10.1186/1471-2164-12-69
- Vicquelin, L., Leray-Forget, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Deflandre, B., Anschutz, P., Etcheber, H., Morin, B., Budzinski, H., Cachot, J., 2011. A new spiked sediment assay using embryos of the

- Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquat. Toxicol.* 105, 235–245. doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.011; 10.1016/j.aquatox.2011.06.011
- Villamil, L., Gómez-León, J., Gómez-Chiarri, M., 2007. Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 968–977. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.dci.2007.01.006
- Villela, I.V., de Oliveira, I.M., da Silva, J., Henriques, J.A.P., 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 605, 78–86. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.02.006
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95–117. doi://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00305-6
- Wang, L., Yue, F., Song, X., Song, L., 2015. Maternal immune transfer in mollusc. *Dev. Comp. Immunol.* 48, 354–359. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.dci.2014.05.010
- Wang, X.-W., Wang, J.-X., 2013. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 981–989. doi:10.1016/j.fsi.2012.08.008
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57–63.
- Wolf, J.B.W., 2013. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Mol. Ecol. Resour.* 13, 559–572. doi:10.1111/1755-0998.12109
- Wootton, E.C., Dyrinda, E.A., Ratcliffe, N.A., 2003. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish Shellfish Immunol.* 15, 195–210.
- Xing, J., Tang, X., Ni, Y., Zhan, W., 2014. Application of monoclonal antibody against granulocytes of scallop *Chlamys farreri* on granulocytes occurrence at different developmental stages and antigenic cross-reactivity of granulocytes in five other bivalve species. *Fish Shellfish Immunol.* 36, 315–319. doi://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.11.001

Xue, Q., Itoh, N., Schey, K.L., Cooper, R.K., Peyre, J.F., La Peyre, J.F., 2009. Evidence indicating the existence of a novel family of serine protease inhibitors that may be involved in marine invertebrate immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 250–259. doi:10.1016/j.fsi.2009.05.006

Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-LoÄjo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, Q., Steinberg, C.E., Wang, H., Qian, L., Liu, X., Yin, Y., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490. doi:10.1038/nature11413

Zhang, L., Li, L., Zhang, G., 2011. Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 603–610. doi://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.01.005

Zhang, W.-L., Du, Y., Zhai, M.-M., Shang, Q., 2014. Cadmium exposure and its health effects: A 19-year follow-up study of a polluted area in China. *Sci. Total Environ.* 470–471, 224–228. doi://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.070

Zhao, X., Yu, H., Kong, L., Li, Q., 2012. Transcriptomic responses to salinity stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0046244

Zuykov, M., Pelletier, E., Harper, D.A.T., 2013. Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93, 201–208. doi://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.001



## **CHAPITRE II**

### **TESTS PRÉLIMINAIRES POUR LA MISE EN PLACE DES TESTS *IN VITRO***

## 1 IDENTIFICATION DE L'ESPÈCE UTILISÉE

Sur les côtes du Canada Atlantique, deux espèces de moules coexistent : *M. edulis* et *M. trossulus* (Gosling 1992). Les moules de l'espèce *M. edulis* prédominent dans des zones de basse salinité et abritées, tandis que celles de l'espèce *M. trossulus* sont plus abondantes sur les côtes ouvertes exposées au vent et aux vagues (Moreau et al., 2005). Sur l'île du Prince Édouard, les populations de moules sont principalement de l'espèce *M. edulis* (Varvio et al., 1988 ; Thomas et al., 2002).

Afin de s'assurer que *M. edulis* était bien l'espèce utilisée dans notre étude, nous avons utilisé un marqueur moléculaire nommé ici Glu 5'. Ce marqueur, a été mis en avant par Rawson et al (1999). Glu 5' est un gène qui code pour une protéine adhésive polyphénolique. Ce marqueur a été identifié et est largement utilisé pour différencier *M. edulis* (Filpula et al., 1990) *M. galloprovincialis* (Inoue & Odo, 1994) et *M. trossulus* (Rawson 1999 et 1996). Nous avons prélevé des morceaux de branchies (1cm<sup>2</sup>) sur les moules utilisées, auxquels nous avons extrait l'ADN en utilisant le kit Qiagen DNeasy Tissue and Blood extraction. Ensuite, nous avons réalisé une PCR traditionnelle pour Glu 5'. Le mélange réactionnel pour la PCR est : 10µL de chaque amorce à 10µM (amorce sens : GTAGGAACAAAGCATGAACC amorce anti-sens : GGGGGGATAAGTTTTCTTAGG), 25µL du Mix (2.5U Taq polymerase-200µM dNTP-1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 3 µL d'eau libre d'ARN/ADNase. Finalement, 2 µl d'ADN ont été ajoutés pour obtenir un volume final de 50µl. Les étapes de la PCR sont décrites dans le tableau suivant (Tableau 6). La taille des amplicons (fragment de gène résultant de la PCR) a été visualisée sur un gel d'agarose à 1%.

Tableau 6 : Cycle de PCR utilisé pour la validation de l'espèce utilisée.

Étape	Temps (s)	Température (°C)	Nombre de cycle
Dénaturation	180	94	1
Dénaturation	20	94	30
Annealing	20	51,3	
Extension	45	72	
Extension	600	72	1
Hold	∞	10	-

Dans le cas où la moule est une *M. trossulus*, la taille de l'amplicon est de 240 « paires de base (pb) », dans le cas contraire, si la moule est une *M. edulis*, alors l'amplicon mesure entre 350 et 380 pb (parfois deux bandes peuvent être amplifiées) (Rawson et al 1999). Dans le cadre de cette étude, les bandes obtenues, pour chaque échantillon de branchie, sont présentées dans la Figure 15.



Figure 15 : Amplicon de PCR spécifique pour le marker Glu 5' pour *M. edulis*.

Tous les fragments possèdent une taille de 350 à 380pb confirmant que l'espèce utilisée est *M. edulis*.

## 2 INFLUENCE DU SEXE DES MOULES SUR LA PHAGOCYTOSE

Il a été suggéré chez les mammifères que le sexe pouvait modifier la sensibilité d'un organisme à des contaminants (Boyle et Craft, 2000). Récemment, il a été montré que le sexe pouvait également avoir une influence sur la sensibilité chez les bivalves aux effets xénobiotiques (Serafim et Bebianno, 2001, McClellan-Green, Romano et Oberdörster, 2007, Metcalfe-Smith, 1994, Matozzo et Marin, 2010). Nous nous sommes alors questionnés sur la possible modulation des fonctions phagocytaires des hémocytes en fonction de leur provenance. En effet, se peut-il que le sexe de la moule bleue (mâle ou femelle) puisse avoir un rôle sur la sensibilité des hémocytes face au contaminant ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la « *retro transcription PCR (RT-PCR)* » pour déterminer le sexe chez les moules bleues, *M. edulis*, ainsi que la cytométrie de flux pour évaluer les capacités phagocytaires des hémocytes exposés au cadmium. La relation entre la phagocytose, la viabilité cellulaire des hémocytes exposés au cadmium et le sexe a pu être étudiée. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un rapport.



## 2.1 Résumé en français

Les moules bleues, *M. edulis*, sont des organismes filtreurs sensibles aux effets des métaux anthropiques tels que le cadmium. L'immunité innée chez les moules bleues est principalement menée par la phagocytose des hémocytes, qui est affectée par des produits chimiques tels que le cadmium. Cependant, l'effet du cadmium sur la phagocytose par rapport au sexe n'est toujours pas clair. Cette étude vise à évaluer le rôle du sexe sur la phagocytose pendant l'exposition *in vitro* des hémocytes au cadmium. À notre connaissance, l'histologie représente la méthode standard pour l'identification du sexe chez *M. edulis*. Cependant, cette méthode prend du temps et principalement cette technique n'est pas fiable pour identifier le sexe des moules au stade indifférencié des gonades. Alternativement, une méthode de RT-PCR plus rapide et plus fiable a été développée dans cette étude. La méthode moléculaire a été comparée à l'histologie. La viabilité et l'activité de phagocytose des hémocytes exposés à  $10^{-9}$ M à  $10^{-3}$ M de cadmium ont été mesurées après 21h d'exposition. Les résultats ont montré que la méthode RT-PCR pourrait être utilisée pour la détermination du sexe comme une technique rapide et fiable. Il a été démontré que le cadmium n'affectait pas la fonction de viabilité et de phagocytose des hémocytes. Aucune différence significative n'a été observée entre les hémocytes mâles et femelles exposés au cadmium. On sait que les hormones stéroïdes sexuelles régulent la phagocytose ; par conséquent, d'autres recherches seraient nécessaires pour relier l'effet du cadmium sur les hormones stéroïdes.

## 2.2 Rapport

### **Phagocytosis responses of *M. edulis* hemocyte, exposed to cadmium, in function of sex**

Philippine Granger Joly de Boissel<sup>a</sup>, Michel Fournier<sup>b</sup>, Frederick Kibenge<sup>a</sup> and Ahmed Siah<sup>\*</sup>

a. Department of Pathology and Microbiology, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, PE C1A 4P3, Canada.

[pdeboissel@upei.ca](mailto:pdeboissel@upei.ca)

[Kibenge@upei.ca](mailto:Kibenge@upei.ca)

b. INRS – Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada

[Michel.Fournier@iaf.inrs.ca](mailto:Michel.Fournier@iaf.inrs.ca)

\*Corresponding author:

British Columbia Centre for Aquatic Health Sciences, 871A Island Highway, Campbell River, BC V9W 2C2, Canada

[ahmed.Siah@cahs-bc.ca](mailto:ahmed.Siah@cahs-bc.ca)

### ABSTRACT

Blue mussels, *M. edulis*, are filter-feeder organism sensitive to the effect of anthropogenic metals such as cadmium. Innate immunity in blue mussels is mainly lead by hemocyte's phagocytosis, which is affected by cationic chemicals such as cadmium. However, the effect of cadmium on phagocytosis in relation to the sex is still unclear. This study aimed at unravelling the role of sex on phagocytosis during exposure hemocytes to cadmium. Viability and phagocytosis activity of hemocytes exposed to  $10^{-9}$ M to  $10^{-3}$ M of cadmium were measured after 21h of exposition. Sex determination was done by RT-PCR using two sex-specific markers known as VCL (male-specific) and VERL (female-specific). It was shown that cadmium affects hemocyte's viability and phagocytosis function. Besides, sex assignment was successful with 100% of accuracy. However, no significant differences were observed between male and female hemocytes exposed to cadmium. It is known that sexual steroid hormones regulate phagocytosis; therefore, further investigations are needed to relate the effect of cadmium on steroid hormones.

### KEYWORDS

Cadmium, Mussel, Viability, Phagocytosis, Sex , VCL, VERL, RT-PCR.

### 2.2.1 Introduction

Blue mussels, *M. edulis* is considered as a sentinel species in several biomonitoring programs. As a sedentary filter feeder, *M. edulis* bioaccumulates contaminants present in its surrounding environment. Environmental pollution by metals such as cadmium (Cd) has increased in aquatic environment due to their extensive use by agriculture and chemical industries. Cd is an immunosuppressant compound capable to enter immune cells using cationic channels in a variety of vertebrates and invertebrates including mollusks (Bruneau et al., 2015; Butler and Roesijadi, 2000; Coteur et al., 2005). The immune system of mussel is composed by hemocytes (blood cells), which play a key role in innate immunity and wound and shell repair of mollusks, and by humoral component. The cells are sensitive to Cd as shown by Brousseau *et al* (2000), Auffret *et al* (2002) and Cherkasov, Grewal, and Sokolova (2007). In mussels, Cd decreases hemocytes viability, phagocytic activity and ability to kill pathogens.

Until recently, sensitivity of aquatic organisms to xenobiotic was not considered as depending of the sex differences. However, it has been suggested in mammals that sexes can modify the sensitivity of an organism to contaminants (Boyle and Craft, 2000). It has been showed that sex may also have an influence in bivalves' sensitivity to xenobiotic effects (Matozzo and Marin, 2010; McClellan-Green et al., 2007; Metcalfe-Smith et al., 1994; Serafim and Bebianno, 2001). In this context, does Cd affect blue mussel hemocyte functionality in a similar way in males and females?

Mussels are unisex (gonochoristic) organisms, but there are no reliable morphological or anatomical methods to assign the gender other than by histology. This method is labour intensive, time-consuming and its accuracy during no-reproductive period is questionable. Indeed, during "spent and rest" reproductive periods, gonads are not developed enough to allow sex differentiation by histology. Recently, a qPCR assay was developed to measure expression of either female-specific vitelline envelop receptor for lysin (VERL) (Galindo et al., 2002) and male-specific vitelline coat lysin (VCL) (Takagi et al. 1994) in the mantle.

The ability of the method to correctly assign sex was validated by Hines et al (2007) and Shedik et al (2010) by a combination of histology and a previously developed end-point RT-PCR for these transcripts. This methodology is fast and its accuracy is high. This study aimed at unravelling the role of sex on phagocytosis during exposure hemocytes to cadmium.



## 2.2.2 Materiel and methods

### 2.2.2.1 Cadmium exposure

A total of 30 blue mussels (*M. edulis*) were randomly collected from pristine site, St-Peter's bay (PEI, Canada) (LeBlanc et al., 2005) and were maintained one week in 12 L of 31‰ artificial saline water (2/3 sterile water and 1/3 of top water and 31g/L Reef Crystal artificial marine salt, Instant Ocean, VA, USA) at 5°C. After one week under the controlled condition, hemolymph was collected from 25 live from the adductor muscle with a three mL syringe and a 22 ½ G needle under aseptic conditions. Viability was checked using the propidium iodide (PI). Cell integrity was assessed by flow cytometry (BD Biosciences FACSCalibur flow cytometer, Becton-Dickinson, San Jose, CA) as previously described (Brousseau et al., 1999). From 30 hemocytes samples, only 12 were used for the *in vitro* exposure. Sex determination was done using RT-PCR procedure described farther in this study. Two sets of five tubes were obtained from each hemolymph samples to measure cells viability and phagocytosis. Each tube had 500 µl of hemolymph containing 100 000 cells. Cells were exposed to different concentration of Cd including a negative control (0M, 10<sup>-9</sup>M, 10<sup>-7</sup>M, 10<sup>-5</sup>M and 10<sup>-3</sup>M of CdCl<sub>2</sub>). A total of 25 µl of Cd was added (for negative control 25 µl of sterile water was used) in each tube. Then, all tubes were stored at 15°C covered with aluminum foil for a total of 21 hours. However, after three hour of incubation a set was removed to stimulate phagocytosis and 11,2 µl of Fluoresbrite Yellow-Green Carboxylate microspheres (PolyScience, Inc.), diameter 1.75µm, at a ratio of 1:100 (haemocyte: beads) were added in each tube (Brousseau et al., 1999). Tubes were replaced at 15°C. After a total of 21 hours of exposition, both sets were removed from the storage room. With the first set, cell viability was measured as previously described. Tubes from the second set (used to measure phagocytosis) were layered over 2 mL of 31‰ salted RPMI 1650 medium containing 3% of BSA and the cell were recovered by centrifugation at 150×g for 8 min at 4°C to remove the free beads. Supernatant was removed and 500µl of fixative solution (31g/L of salted solution with 1% of formaldehyde and 0.5% of sodium azide) were added to suspend cell pellet. Samples were read by the FACSCalibur using wavelength 488/530 (FL1) to obtain engulfed beads fluorescence (FU). For each tube 10000 events were recovered. Phagocytic activity is evaluated in living cells.

### 2.2.2.2 Sex determination

Mussels were maintained in saline water as described earlier. After one week under the controlled condition, gonads were collected from 12 mussels using sterile forceps and scissors. To avoid cross-contamination forceps and scissors were cleaned each time using ethanol and were rinsed twice with saline water. Gonads were stored in 5 ml of saline water to perform histology and RNA extraction. RNA extraction was done using the Mini Kit Qiagen (Qiagen, Canada) on 1cm<sup>2</sup> of gonadal tissue. OneStep Kit (Qiagen, Canada) was used to run the retro-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Based on Hines et al (2007) and Sedik et al (2010) study, RT-PCR was used to performed sex differentiation. Two genes were used: the vitelline envelope receptor lysine (VERL) and the vitelline coat lysine (VCL). In this study, PCR conditions were optimized and validated to generate an unique PCR product for both genes. Optimization was performed using VLC primers previously designed by Sedik *et al* (2010) and VERL primers provided by Hines et al (2007). Histological observations were performed to validate the PCR results. The RT-PCR reaction contained 2µL of RNA, 10 µl of 5X buffer (1X-2.5mM Mg<sup>2+</sup>), dNTP (0.4mM), 5µM of forward and reserve primers for VLC and VERL in separates tubes (VERL-F: 5' CTGCAATGGTTTTGGTTGTG 3'; VERL-R 5' CCGAAGGAAATGGAACTGAA 3'; and VCL-F: 5' AGAGCTGTTTTGGCCACAGT 3'; VCL-R: 5' TTGCGTTTTCACATGGTTGAT 3'), RNase Inhibitor (400µM) and 2 µl of RT enzyme. RT-PCR cycling condition for VERL and VCL were retro-transcription at 50°C for 30 min followed by initial denaturation at 95°C for 15 min, followed then by 30 cycles of 94°C denaturation for 30s, 55°C annealing for 30 s, and 72°C extension for 1 min and finishing with a final extension at 72°C for 10 min. The resulting PCR products were analyzed on a 1% agarose gel using ethidium bromide. Sex-specific bands at 250 and 350 bp were used to identify males and females, respectively. A positive VERL and VCL control was used for both genes. To validate the protocol and efficacy of sex determination, RT-PCR was done on 36 mussels haphazardly selected. For histological analysis, gonadal tissues were dehydrated, embedded in paraffin wax and stained with hematoxylin and eosin. Slides were examined under a microscope connected to a camera (Axio Cam HRC, Imager IA), and sex was determined by the presence of male or female gonads follicles.

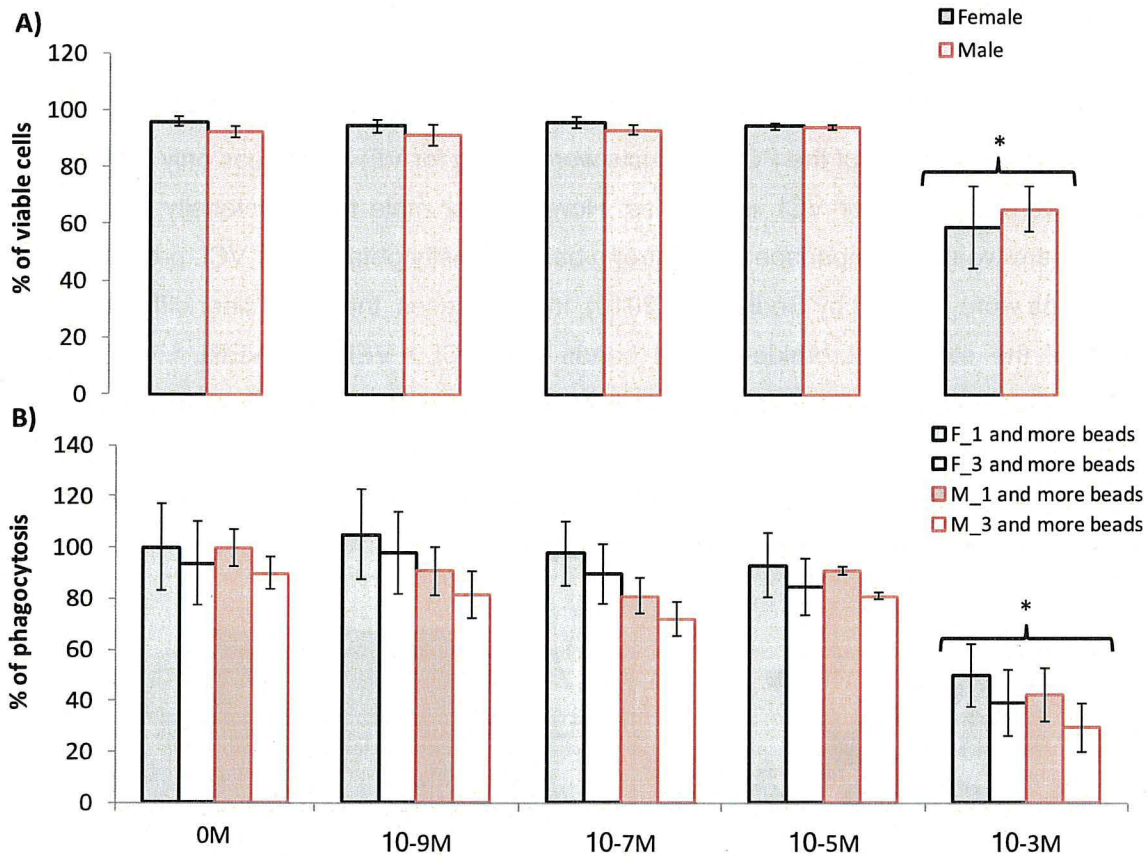
### 2.2.2.3 Statistics

Statistical analyses were performed in RStudio (<https://www.rstudio.com/>) for cell viability and phagocytosis activity. Normality and homoscedasticity were checked using Shapiro-Wilk test and Bartlett test, respectively. For parametric data (normal data having similar homoscedasticity) an ANOVA followed by a Tukey test was done. For non-parametric data, Kruskal-Wallis test was applied. A p-value < 0.05 was used. For PCR products visualize in gel, the intensity of bands was used to determine the sex, so no statistical analysis was done. For phagocytosis activity, results are based on non-exposed cells activity using the parameter 1 and more beads. We have considered in this study that non-exposed cells (0M) have 100% of phagocytic activity for 1 and more beads parameter and based on that; Cd-exposed cells phagocytosis activity was calculated.

### 2.2.3 Results and discussion

In this study, phagocytosis and viability of hemocytes exposed to  $10^{-3}$ M of Cd for 21 hours decreased significantly in comparison to the control (Fig 1). Our results showed that Cd had no effect on phagocytosis and viability of hemocytes when exposed at concentrations ranging from  $10^{-9}$  to  $10^{-5}$ M. For controls and  $10^{-9}$  to  $10^{-5}$ M Cd-exposed cells, viability was higher than 95% while for  $10^{-3}$ M Cd-exposed, viabilities were 59% for females and 62% for males. As for phagocytosis activity, female hemocytes exposed to  $10^{-3}$ M Cd decreased by 50% and 60% whereas male hemocytes, phagocytosis activity decreased by 58% and 70%. Several studies investigated effect of cadmium on phagocytosis and cell survival (Fournier et al., 2001; Franchi and Ballarin, 2013; Sauvé et al., 2002). Results showed that viability decreased considerably when hemocytes are exposed to  $10^{-5}$  to  $10^{-3}$ M of Cd. In addition, previous studies showed that phagocytosis activity of hemocytes decreased by 10% when hemocytes are exposed to  $10^{-4}$ M of Cd and 50% of inhibition was observed at  $10^{-3}$ M of Cd (Gagnaire et al., 2004).

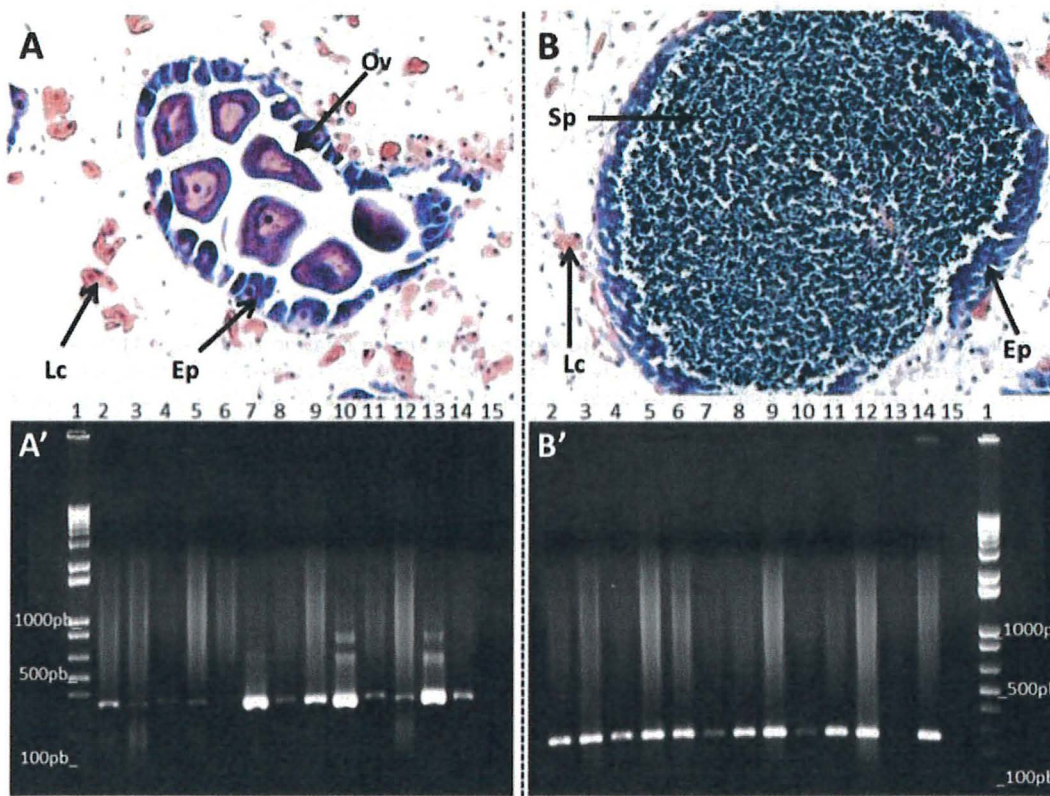




**Figure 1: Immunological response of hemocytes exposed to cadmium in relation to the sex A) Percentage of viable cells; B) Percentage of phagocytosis activity for female (F) and male (M). Results are given as mean  $\pm$  standard deviation (n=12). Asterisks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between controls and treatment.**

The Vitelline envelope receptor lysine (VERL) is a receptor for lysine synthesized in the vitelline envelope of eggs. This receptor is specific to female and its role is to bind the lysine released by the sperm (Galindo et al., 2002). However, the vitelline coat lysine (VCL) is a male-specific gene found in sperm-head. VCL's role is to release the lysine to create a hole in eggs (Marino et al., 1992). Both genes are continuously expressed as housekeeping genes, which make them as markers suitable for sex determination in *M. edulis*. Sex differentiation by histology was performed during gonad development and spawning period (Fig 2. A and B). However, sex determination is challenging and inaccurate by histology during spent and rest periods. For instance, Hines *et al* (2007) were not able to identify the sex during gonad spent period of the animals where all the germ cells were released in the environment. However, all individuals were sexually differentiated by histology during the ripe stage of the reproductive cycle.

Sedik *et al* (2010) could determine mussel's sex at 73% using RT-PCR and 91% using traditional PCR. In our study, histology was performed on 11 animals, four females, five males and two undetermined individuals (Table 1) and RT-PCR was used on gonads from the same individuals (Fig 2-A' and B'). Intensity of the PCR products were strong for VERL whereas only light intensity of bands were obtained for VCL in females. However, for male tissue, intensity of the VERL products were weak in comparison to the strong band intensity obtained for VCL product. Similar observations were resulted by Sedik *et al* (2010). In most cases, there is a clear difference in the intensity of the ethidium bromide-stained bands with VCL > VERL or VERL > VCL allowing therefore a sex assignment based on agarose gel band intensity. Comparing histology staining and RT-PCR products (Table 1), data were consistent with sex differentiation. Later, RT-PCR analysis was repeated on 36 mussels and the accuracy of the analysis was 100% (with 44% of males and 56% of females) in comparison to histology data.



**Figure 2 : Microscopically visualization (20X - Axio Cam HRC) of stained gonads from *M. edulis* and rt-PCR product ethidium-bromide staining bands visualization on 1% agarose gel. A/A'. Female gonad and VERL-PCR products (350pb). B/B'. Male gonad and VCL-PCR product (245pb). Sp: spermatozooids, Ep= epithelium cells, Lc= Leydig cells and Ov= ovules.**



**Tableau 1: Sex of mussels determined by histology, bands intensity of VCL and VERL PCR products obtain in Fig. 1A' and 1B' and final sex assignment based on RT-PCR results.**

Histology	Gel wells	Bands relation	intensity	Sex based on intensity of VCL/VERL bands
-	Ladder	1 kb	-	-
-	2	Positive control	-	-
Male	3	VERL < VCL	-	Male
Male	4	VERL < VCL	-	Male
Male	5	VERL < VCL	-	Male
Male	6	VERL < VCL	-	Male
Female	7	VERL > VCL	-	Female
Female	8	VERL < VCL	-	Female
No determined	9	VERL ≈ VCL	-	NA
Female	10	VERL > VCL	-	Female
No determined	11	VERL < VCL	-	Male
Male	12	VERL < VCL	-	Male
Female	13	VERL > VCL	-	Female
-	14	Positive control	-	-
-	15	H <sub>2</sub> O	-	-

\*positive controls for VERL and VCL in their respective gels.

Effect of Cd on hemocytes was investigated in our study in relation to sex determination. Our results showed that no significant effects were observed between females and males for viability and phagocytosis for all treatment (Fig 1). It has been suggested that phagocytosis and hemocytes viability are affected by many factors among which the reproduction cycle of bivalves. Indeed, Matozzo and Marenzi (2010) suggested that bivalves are more sensitive during spawning time because of the energy costs. It has also been suggested that sex and gonad developments might modify hemocytes function by migration of these cells toward gonadic follicles. This might lead to variation of circulating hemocytes number (THC) and their role in immune defenses (Cajaraville et al., 1996). However, Duchemin, Fournier, and Auffret (2007) did not observe any differences of phagocytosis, hemocyte viability and THC in function of sex for the pacific oysters, *C. gigas* through the reproductive cycle. Previous studies showed that no significant difference of viability and phagocytosis activities between sex in Cd-exposed hemocytes reinforcing therefore our findings (Dang et al., 2012; Matozzo and Marin, 2010).



In addition, no effect of gender was found in THC, viability or phagocytosis for *S. glomerata* (Ketata et al., 2007), *P. fucata* (Dang et al., 2012), *R philippinarum* (Matozzo and Marin, 2010) and *M. arenaria* (Gagné et al., 2008).

To the best of our knowledge, this is the first study highlighting no direct effect between Cd-gender sensitivity and phagocytosis in blue mussel's hemocytes. However,  $10^{-3}$ M of Cd induced hemocytes mortality and a decrease in phagocytosis activity. Although our results showed that no effect was observed between genders, they clearly show that cadmium affects the immune system of mussels. Cd is known to be an endocrine disruptor and it acts individually or in synergy with other contaminants as reproductive perturbers. Cadmium has the potential to disrupt the hormonal and energy status of many bivalves. It has been suggested that Cd may affect sex determination by affecting the gonad development and/or modification of the endocrine systems however further analysis are needed to understand the role of phagocytosis depending of the gender (Girón-Pérez, 2010).

#### 2.2.4 Conclusion

Our results showed that all the individuals were successfully identified by both histology and RT-PCR. Effect of Cd was also investigated but no relation between gender and cadmium sensitivity was observed for hemocytes' phagocytic activities although Cd at  $10^{-3}$ M had significant effect on hemocyte viability and phagocytosis. However, further investigations are needed to unravel the role of Cd as endocrine disruptors in blue mussels.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Ramona Taylor and Sarah Bernard for their technical assistance and Dr. David Groman for his help with histology slides interpretation. This study was funded by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Strategic Grant.

### 3 RÉFÉRENCES

- Boyle, S.P., Craft, J.A., 2000. Gender-specific metabolism of benz[a]anthracene in hepatic microsomes from Long-Evans and Hooded Lister rats. *Chem. Biol. Interact.* 125, 209–220. doi:10.1016/S0009-2797(00)00147-2
- 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. doi://dx.doi.org.proxy.library.uepi.ca/10.1016/S0300-483X(99)00165-1
- Bruneau, A., Fortier, M., Gagne, F., Gagnon, C., Turcotte, P., Tayabali, A., Davis, T.A., Auffret, M., Fournier, M., 2015. In vitro immunotoxicology of quantum dots and comparison with dissolved cadmium and tellurium. *Environ. Toxicol.* 30, 9–25. doi:10.1002/tox.21890
- Butler, R., Roesijadi, G., 2000. Metallothionein (MT) gene expression and cadmium-induced immunotoxicity in hemocytes of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 50, 470. doi:10.1016/S0141-1136(00)00224-5
- Cajaraville, M.P., Olabarrieta, I., Marigomez, I., 1996. In Vitro Activities in Mussel Hemocytes as Biomarkers of Environmental Quality: A Case Study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 253–260. doi:10.1006/eesa.1996.0108
- Coteur, G., Gillan, D., Pernet, P., Dubois, P., 2005. Alteration of cellular immune responses in the seastar *Asterias rubens* following dietary exposure to cadmium. *Aquat. Toxicol.* 73, 418–421. doi:10.1016/j.aquatox.2005.04.003
- Dang, C., Tan, T., Moffit, D., Deboutteville, J.D., Barnes, A.C., 2012. Gender differences in hemocyte immune parameters of bivalves: The Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* and the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 138–142. doi:10.1016/j.fsi.2012.04.007
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y., Brousseau, P., 2001. Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology* 161, 201–211. doi:10.1016/S0300-483X(00)00387-5
- Franchi, N., Ballarin, L., 2013. Influence of cadmium on the morphology and functionality of haemocytes in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 158, 29–35. doi:10.1016/j.cbpc.2013.04.003

Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2004. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 501–512. doi:10.1016/j.fsi.2003.08.007

Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Fournier, M., Durand, M.J.J., Talbot, A., Gagne, F., Blaise, C., Pellerin, J., Fournier, M., Durand, M.J.J., Talbot, A., Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Fournier, M., Durand, M.J.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. doi:10.1016/j.envint.2007.06.010

Galindo, B.E., Moy, G.W., Swanson, W.J., Vacquier, V.D., 2002. Full-length sequence of VERL, the egg vitelline envelope receptor for abalone sperm lysin. *Gene* 288, 111–117. doi:10.1016/S0378-1119(02)00459-6

Girón-Pérez, M.I., 2010. Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution. *ISJ* 7, 149–156.

Ketata, I., Smaoui-Damak, W., Guermazi, F., Rebai, T., Hamza-Chaffai, A., 2007. In situ endocrine disrupting effects of cadmium on the reproduction of *Ruditapes decussatus*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 146, 415–430. doi:10.1016/j.cbpc.2007.05.002

LeBlanc, N., Landry, T., Stryhn, H., Tremblay, R., McNiven, M., Davidson, J., 2005. The effect of high air and water temperature on juvenile *Mytilus edulis* in Prince Edward Island, Canada. *Aquaculture* 243, 185–194. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.09.035

Marino, R., De Santis, R., Hirohashi, N., Hoshi, M., Pinto, M.R., Usui, N., 1992. Purification and characterization of a vitelline coat lysin from *Ciona intestinalis* spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 32, 383–388. doi:10.1002/mrd.1080320412

Matozzo, V., Marin, M.G., 2010. First evidence of gender-related differences in immune parameters of the clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia). *Mar. Biol.* 157, 1181–1189. doi:10.1007/s00227-010-1398-4

McClellan-Green, P., Romano, J., Oberdörster, E., 2007. Does gender really matter in contaminant exposure? A case study using invertebrate models. *Environ. Res.* 104, 183–191. doi:10.1016/j.envres.2006.09.008

Metcalf-Smith, J.L., Metcalfe-Smith, J.L., Metcalfe-Smith, J.L., 1994. Influence of species and sex on metal residues in freshwater mussels (family unionidae) from the St. Lawrence river, with



implications for biomonitoring programs. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1433–1443. doi:10.1002/etc.5620130907

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. doi:10.1016/S0166-445X(01)00232-6

Serafim, M.A., Bebianno, M.J., 2001. Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: sex and seasonal effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 544–52. doi:10.1002/etc.5620200313

## CHAPITRE III

### **RÉPONSES FONCTIONNELLES ET MOLÉCULAIRES DES HÉMOCYTES DE *M. EDULIS* EXPOSÉS AU CADMIUM : UN MODÈLE *IN VITRO* ET UNE APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE (PUBLICATION #1).**

FUNCTIONAL AND MOLECULAR RESPONSES OF BLUE MUSSEL *M. EDULIS* HEMOCYTES  
EXPOSED TO CADMIUM - AN *IN VITRO* MODEL AND TRANSCRIPTOMIC APPROACH

Article publié dans: *Fish & Shellfish Immunology* - 67 (2017) 575-585

doi: 10.1016/j.fsi.2017.06.001

## CONTRIBUTION DES AUTEURS

J'ai, Philippine Granger Joly de Boissel à titre de première auteure, réalisé toutes les expériences présentes dans cette publication et j'ai analysé les résultats. J'ai aussi participé à la rédaction de chaque section du manuscrit.

Le Dr. Rodriguez-Lecompte a révisé l'article et l'ingénieure de laboratoire Mme McKenna a participé aux manipulations en laboratoire.

Les Dr. Fournier, Dr. Kibenge et Dr. Siah ont participé à la conception du projet et à la révision de l'article.

---



## 1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Le mollusque, *M. edulis*, est utilisé comme espèce sentinelle dans plusieurs programmes de surveillance en raison de sa capacité à bioaccumuler les contaminants. Son système immunitaire se compose d'hémocytes et de composants humoraux, qui constituent la partie principale de l'hémolymphe. La présente étude vise à comprendre les effets du Cd sur les gènes impliqués dans la phagocytose des hémocytes de *M. edulis*. Notre approche se base sur un modèle *in vitro*, exposant les hémocytes à différentes concentrations de Cd de  $10^{-9}$  M à  $10^{-3}$  M. La phagocytose et viabilité cellulaire ont été mesurées à l'aide de cytométrie en flux. Les mécanismes moléculaires régulés par le Cd ont été étudiés à l'aide d'une analyse RNA-seq et DGE. Les résultats ont montré que la viabilité et la phagocytose des hémocytes exposés à  $10^{-3}$  M de Cd ont diminué de manière significative après 21 h d'exposition. Les données de séquençage de l'ARN ont mis en avant que 1112 transcrits (sur 352,976 contigs) étaient différentiellement exprimés par la plus forte concentration de Cd. Parmi ces gènes, 1028 et 84 ont été surexprimés et réprimés respectivement. L'induction de la superoxyde dismutase (*SOD*), de la glutathion-s-transférase (*GST*), du cytochrome P450 2C8 (*CYP2C8*), de la protéine multidroque (*MRP1*) et de la protéine de choc thermique 70 (*HSP70*) suggère que le Cd peut réguler les principaux mécanismes moléculaires. De plus, plusieurs récepteur Toll-like (*TLR*) ainsi que des gènes codant pour des protéines impliquées dans la phagocytose (*Act* et *CDC42*) et l'apoptose (« *caspase 8 (CAS8)* » et « *X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP / IAP)* ») ont été induits suite à l'exposition au Cd. Ces résultats mettent en évidence l'effet du Cd sur la fonction phagocytaire des hémocytes de *M. edulis* ainsi que la régulation de l'expression génique impliquée dans l'immunité innée, la désintoxication et l'apoptose.

## 2 ARTICLE

**Functional and molecular responses of blue mussel *M. edulis* hemocytes exposed to cadmium - An *in vitro* model and transcriptomic approach.**

Philippine Granger Joly de Boissel<sup>a</sup>, Michel Fournier<sup>b</sup>, Juan Carlos Rodriguez-Lecompte<sup>a</sup>, Patty McKenna<sup>a</sup>, Frederick Kibenge<sup>a</sup>, Ahmed Siah<sup>c\*</sup>

a. Department of Pathology and Microbiology, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, PE C1A 4P3, Canada.

[pdeboissel@upei.ca](mailto:pdeboissel@upei.ca)

[Kibenge@upei.ca](mailto:Kibenge@upei.ca)

[jrodriguez@upei.ca](mailto:jrodriguez@upei.ca)

b. INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada.

[Michel.Fournier@iaf.inrs.ca](mailto:Michel.Fournier@iaf.inrs.ca)

c. British Columbia Centre for Aquatic Health Sciences, 871A Island Highway, Campbell River, BC V9W 2C2, Canada

\*Corresponding author: [ahmed.Siah@cahs-bc.ca](mailto:ahmed.Siah@cahs-bc.ca)

## ABSTRACT

The bivalve mollusk, *M. edulis*, is used as a sentinel species in several monitoring programs due to its ability to bio-accumulate contaminants. Its immune system consists of hemocytes and humoral components, which constitute the main part of the hemolymph. The present study is aimed at understanding the effects of Cd on the differentially expressed genes involved in the phagocytosis of *M. edulis*' hemocytes. Our approach focuses on an *in vitro* model by exposing hemocytes to different concentrations of Cd ranging from  $10^{-9}$  M to  $10^{-3}$  M. Phagocytosis and cell viability as functional markers were measured using flow cytometry. The molecular mechanisms regulated by Cd were investigated using RNA-seq and DGE analysis. Results showed that viability and phagocytosis of hemocytes exposed to  $10^{-3}$  M of Cd were significantly decreased after 21 h of exposure. RNA sequencing data showed that 1112 transcripts (out of 352,976 contigs) were differentially regulated by the highest concentration of Cd. Among these identified transcripts, 1028 and 84 were up and down-regulated respectively. The induction of super oxide dismutase (SOD), glutathion-s-transferase (GST), cytochrome P450 2C8 (CYP2C8), multidrug resistance protein (MRP1) and heat shock protein 70 (HSP70) suggests that Cd can regulate key molecular mechanisms. In addition, several toll-like receptors (TLR) as well as genes involved in phagocytosis (actin and CDC42) and apoptosis (caspase 8 and XIAP/IAP) were induced by Cd. Thus, our model highlights the effect of Cd on the phagocytic function of *M. edulis*' hemocytes along with the regulation of gene expression involved in innate immunity, detoxification and apoptosis. Further investigations need to be pursued to unravel the effects of Cd on the molecular mechanisms identified in this study.

## HIGHLIGHTS

*M. edulis*, *in vitro* model, cadmium, hemocytes, phagocytosis, transcriptomic, molecular pathways

## ABBREVIATIONS

Cd: cadmium, CDC42: Cell division control protein 42 homolog, XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein, IAP: inhibitor of apoptosis



## 2.1 Introduction

Environmental pollution by non-essential metals such as cadmium (Cd) has increased due to their extensive use in agriculture and chemical industries [1]. Cd disrupts physiological signaling processes resulting in molecular signalling dysfunction. As a nonessential cation for animals, Cd enters in cells *via* Ca<sup>2+</sup>. Cellular membrane channels and binds to the cytoplasmic and nuclear materials [2]. In addition, Cd can induce reactive oxygen species (ROS) by depleting cellular glutathione and antioxidant enzymes, even though it is considered as a redox-inactive metal that does not catalyze a Fenton-type reaction. It can induce toxicological changes by affecting physiological, cellular function and molecular mechanisms. Consequently, these effects may result in cell death and ultimately affect organisms' survival [3]. Bivalve mollusks inhabiting marine coastal areas are ubiquitous, filter feeders and sedentary [4]. Due to their capacity to filter large volumes of aquatic material, they bio-accumulate xenobiotics present in their surrounding aquatic ecosystem [5]. Therefore, they have been used as sentinel organisms in several biomonitoring programs [6]. Their immune system is innate and is made up of an open and vascular system including hemocytes and humoral components [3,7]. Hemocytes are involved in many physiological functions including phagocytosis, homeostatic maintenance as well as reproduction [8]. Phagocytosis is the main function of hemocytes and it is a cellular process involving three main steps. Firstly, foreign particles are recognized by cells and ingested in the phagosome through production of oxidative compounds, antimicrobial factors and hydrolytic enzymes synthesized in lysosomes [9]. The second step is the fusion of lysosomes with the phagosome forming the phagolysosome complex. Finally, the foreign particles are degraded by the digestive enzymes synthesized in lysosomes [10,11]. The resulting waste material is discharged from the phagocyte by exocytosis. These steps involve different molecules and pathways as described previously by several studies [9,12]. Recently, RNA-seq analysis has been widely used because it allows to study genes regulated by xenobiotics and therefore identify molecular mechanisms involved in stressed cells. Moreover, RNAseq is now accessible due to the low cost, fast and high throughput next-generation sequencing (NGS) technologies developed by Illumina HiSeq and 454 Roche, SOLiD or Ion Torrent. Studies of whole transcriptome sequencing has recently been applied to the study of host-pathogen interaction in hemocytes of blue mussels *M. edulis* [13]. Several bivalve transcriptomes are publicly available for *Mytilus galloprovincialis* (*M. galloprovincialis*), *Bathymodiolus azoricus* (*B. azoricus*), *Patinopecten yessoensis* (*P. yessoensis*), *Ruditapes philippinarum* (*R. philippinarum*), *Corbicula fluminea* (*C. fluminea*) and *Crassostrea gigas* (*C. gigas*) [14,15].

There are also 985 entries from the class Bivalvia deposited in the NCBI Short Read Archive (SRA) (updated in d12/08/2016) and more than 82,710 expressed tag sequences (EST) for bivalves but only 5300 EST for *M. edulis*. However, few studies have been performed on *M. edulis* hemocytes exposed to metals [16,17] and to the best of our knowledge, no studies have been carried out to understand the molecular mechanisms involved in the phagocytosis of hemocytes exposed to cadmium. The present study is aimed at understanding the effects of Cd on the differentially expressed genes involved in the phagocytosis of *M. edulis*' hemocytes. Our specific objectives were i) to develop an *in vitro* model by exposing hemocytes to different Cd concentrations, ii) to assess the phagocytosis of hemocytes exposed to Cd and gene expression levels and iii) to identify the molecular mechanisms related to phagocytosis using a differential gene expression approach.

## **2.2 Materials and methods**

### **2.2.1 Mussels collection and hemocytes extraction**

A total of 40 blue mussels were collected from a pristine site, St- Peter's Bay (PEI, Canada) [18]. Individuals were kept for one week in 12 L of 31‰ artificial saline water (2/3 sterile water and 1/3 of top water and 31 g/L Reef Crystal artificial marine salt, Instant Ocean, VA, USA) at 5°C. Water was changed every two days; and mussels were fed every two days with phytoplankton (Phytoplex, Kent marine, WI, USA.). After one week under the controlled conditions, hemolymph was collected from 30 live mussels from the adductor muscle with a 3 mL syringe and a 22 G needle under aseptic conditions. Hemolymph containing hemocytes was kept and stored at room temperature [19].

### **2.2.2 Determination of cell viability**

Viability was assessed using propidium iodide (PI) and cell integrity was measured by flow cytometry (BD Biosciences FACSCalibur flow cytometer, Becton-Dickinson, San Jose, CA) as previously described in Ref. [19]. Briefly, 3 mL of 1 mg/mL PI (Sigma Chemical Company) was added to 300 mL of each cell suspension and flow cytometric acquisitions of cells were performed. Fluorescence emission was collected at 625 nm (FL3). For each sample, 10,000 events were collected and the results were expressed as a percentage of viable cells [20].



### 2.2.3 *In vitro* hemocytes exposure

Out of the 30 hemolymph samples, only 12 were used for *in vitro* exposure. Three sets of five tubes were obtained from each hemolymph sample. Each tube had 500  $\mu$ L of hemolymph containing  $10^5$  cells. Sets were labelled: 1-viability, 2-phagocytosis and 3-RNAseq. All resulting samples were exposed to different concentrations of Cd ( $10^{-9}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-5}$  M and  $10^{-3}$  M of Cd<sup>2+</sup>) including a negative control based on results previously obtained by Sauve et al. [20]. Twenty five microliters of Cd was added (for negative control 25  $\mu$ L of sterile water was used) in each tube containing already  $10^5$  cells. Then, all tubes were stored at 15 C covered with aluminum foil for 21 h. As for the tubes from set 2-phagocytosis, they were removed from the storage room after three hours of incubation. To stimulate phagocytosis, 11.2  $\mu$ L of Fluoresbrite Yellow-Green Carboxylate microspheres (PolyScience, Inc.), diameter 1.75  $\mu$ m, at a ratio of 1:100 (hemocyte: beads) was added to each tube [21]. Then, set 2-phagocytosis was stored at 15 C with the other sets. This exposure duration corresponds to the time required to experimentally obtain optimal phagocytosis activity [19,20].

### 2.2.4 Cell viability, phagocytic activity and RNA samples

After 21 h, tubes were removed from the storage room. For viability, 5  $\mu$ L of PI at 1 mg/L was added to each tube and 10,000 events were collected using flowcytometer. For phagocytosis, tubes were layered over 2  $\mu$ L of 31%o salted RPMI 1650 medium containing 3% BSA and the cells were collected after centrifugation at 150 g for 8 min at 4 C [21]. Supernatant was removed and 500  $\mu$ L of fixative solution (31 g/L of salted solution with 1% of formaldehyde and 0.5% of sodium azide) was added to suspend the cell pellet. Samples were read by the FACSCalibur at the 488/530 (FL1) wavelength to obtain engulfed beads fluorescence. For each tube, 10,000 events were recovered. The phagocytic activity was assessed in living cells using only two parameters: 1) the ability of cells to engulf one or more beads and 2) the ability of cells to engulf three or more beads. Tubes from set 3-RNA-seq were centrifuged at 4 C for 15 min at 300rpm to create a cell pellet (containing  $10^5$  cells). The supernatant was removed and cells were used for RNA extraction (cells were stored for a maximum of three days at 80 C prior to RNA extraction).



## 2.2.5 RNA extraction, cDNA library preparation and RNA-Seq by illumina sequencing

Cell pools were done using set 3-RNA-seq cell pellets to obtain final concentrations ranging from 350,000 to 500,000 cells. RNA extraction was done for negative control and cells exposed to  $10^{-3}$  M of Cd. It was performed using MicroRNAeasy Kit (Qiagen, Canada) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was measured using the NanoDrop spectrophotometer (Thermo-Fisher Scientific, DE, US), and RNA quality was assessed using the Experion RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad Ltd. ON, Canada). cDNA libraries and sequencing were performed at the McGill University and Genome Quebec Innovation Centre (Montreal, Canada Genome, Quebec) for eight samples (four nonexposed cells and four Cd-exposed cells). The mTrueStranded Kit was used to prepare the cDNA libraries and paired-end sequencing was performed.

## 2.2.6 RNA-seq analysis

### 2.2.6.1 Transcriptome assembly and annotation

Eight cDNA libraries were sequenced in total. Adaptors, low quality bases and reads having a smaller length than 50 pb were removed using Trimmomatic [22]. To assemble the transcriptome, trimmed reads from the eight libraries were used. Normalization was done using Trinity normalization inspired by Dignorm algorithm [23]. Fragments with a sequencing coverage higher than 50X were used to assemble de novo the transcriptome with the Trinity assembler [24] (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>). The resulting 352,976 contigs were annotated using Trinotate (<https://trinotate.github.io>) and queried against the NCBI nonredundant protein database and SwissProt protein database using BLASTx with an e-value of  $10^{-5}$ . Two BLASTx searches were done: one against bivalve database (taxid: 6544) and the second with all NCBI/SwissProt database. Functional annotation of molecular pathways was done with Ontology terms (GO) and KEGG pathways with Panther ([www.pantherdb.org](http://www.pantherdb.org)), UniProt (<http://www.uniprot.org/>) and KEGG websites ([www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)).

### 2.2.6.2 Differential gene expression (DGE)

DGE analysis was performed on the eight libraries. Transcripts abundance was estimated by mapping reads against the de novo assembled transcriptome for each library and transcript abundance estimation was performed using RSEM [25]. Reads count are linearly correlated with the abundance of transcripts and they were obtained from non-overlapping genes for the most abundant isoform [26]. DGE was performed using DESeq and edgeR packages from Bioconductor in R. In this study, a FDR (p-value adjusted or false discovery rate) lower than 0.05 and the absolute value of  $|\log_{2}FC|$  of 2 was used to discriminate expressed and non-expressed transcripts. A volcano plot was generated to identify the differentially expressed contigs (Fig. 4B). GO terms and KO number were used to highlight changes in immunological pathways that may be induced by Cd. The  $\log_{2}(CPM)$  was calculated using the count per million (cpm) function implemented in the edgeR package. The  $\log_{2}(CPM)$  represent the log base 2 of CPM (edge R package) for each transcript. Negative logs represent transcripts having less than one cpm and positive ones represent transcripts having more than one cpm.

### 2.2.6.3 Identification of immune-related transcripts

Based on DGE analysis and transcriptome annotation, over and under expressed genes having a KO number associated to phagosome (KO04145) and apoptosis (KO04210) pathways were preferred and selected for further analysis. To validate the *in vitro* exposure to Cd, traditional biomarkers used for metals were also explored through the transcriptome and studied. Reads per kilobase per million (RPKM) was calculated using rpkM function from edgeR package and transcripts lengths (obtained during the assembly). RPKM value is strongly related to gene expression and could be used to compare expression between multiples samples [27].

## 2.2.7 Statistical analysis

For phagocytosis activity and cell viability, normality and homoscedasticity were verified using Shapiro and Bartlett tests respectively. If normality and homoscedasticity were verified then data were considered as parametric and ANOVA followed by a Tukey test were done. For non-parametric data, Kruskal-Wallis test was applied. Statistical analysis was done in R 3.2.3 (<https://www.rproject.org>), DGE analysis enrichment was done using Bioconductor edgeR package based on exactTest. For all statistical tests, a p-value < 0.05 was used.

## 2.3 Results and discussion

### 2.3.1 Viability and phagocytic activity after Cd exposure

Phagocytosis and viability (Fig. 1) of hemocytes exposed to a nominal concentration of Cd of  $10^{-3}$  M for 21 h significantly decreased with a  $p$ -value  $< 0.05$  (61.3% of live cells with 47.02% and 35.7% of phagocytosis activity) in comparison with the control (94.5% of live cells with 100% and 92.34% of phagocytosis activity). However, no significant effect was observed in hemocytes exposed to Cd with concentration ranging from  $10^{-9}$  M to  $10^{-5}$  M (Fig. 1). Similarly, Sauve et al. [20] observed that concentrations ranging from  $10^{-9}$  M to  $10^{-5}$  M of several metals did not affect the viability of cells. Recently, Franchi and Ballari [27] observed an inhibition of cell viability at  $10^{-8}$  M of Cd, while Gagnaire et al [28] did not find any effects of Cd on oyster hemocytes exposed for 24 h to concentrations ranging from  $10^{-11}$  to  $10^{-4}$  M. Phagocytosis activity data showed that the number of fluorescent beads engulfed by hemocytes significantly decreased when hemocytes were exposed to  $10^{-3}$  M of Cd whereas no effect was observed at lower concentrations (Fig. 1). Previous studies showed that 10% of *M. edulis* phagocytosis activity was inhibited when hemocytes were exposed to  $10^{-4}$  M of Cd [29]. In soft shell clams, such as *Mya arenaria*, it was shown that  $10^{-4}$  M and  $10^{-3}$  M of Cd inhibited 50% of hemocytes' phagocytosis activity [29]. Similarly, in our study, hemocytes exposed to  $10^{-3}$  M of Cd had 52.98% of inhibition of their phagocytosis activity.

### 2.3.2 Sequence statistics

In this study, total RNA was extracted from the exposed and control hemocytes and sequences were generated from eight libraries using Illumina technology. More than 42 million reads were generated from each library. After trimming and cleaning processes, a total of 341,718,828 reads were used in further analysis. Among these trimmed reads, 5.47% were used for "de novo" assembly (18,679,409 reads) based on Trinity normalization [23]. A descriptive statistic of the transcriptome is summarized in Table 1. A total of 352,976 contigs were generated with a mean length of 707bp, N50 of 1,041 pb and a GC content of 34%. The contigs lengths ranged from 224 pb to 32,352 pb.



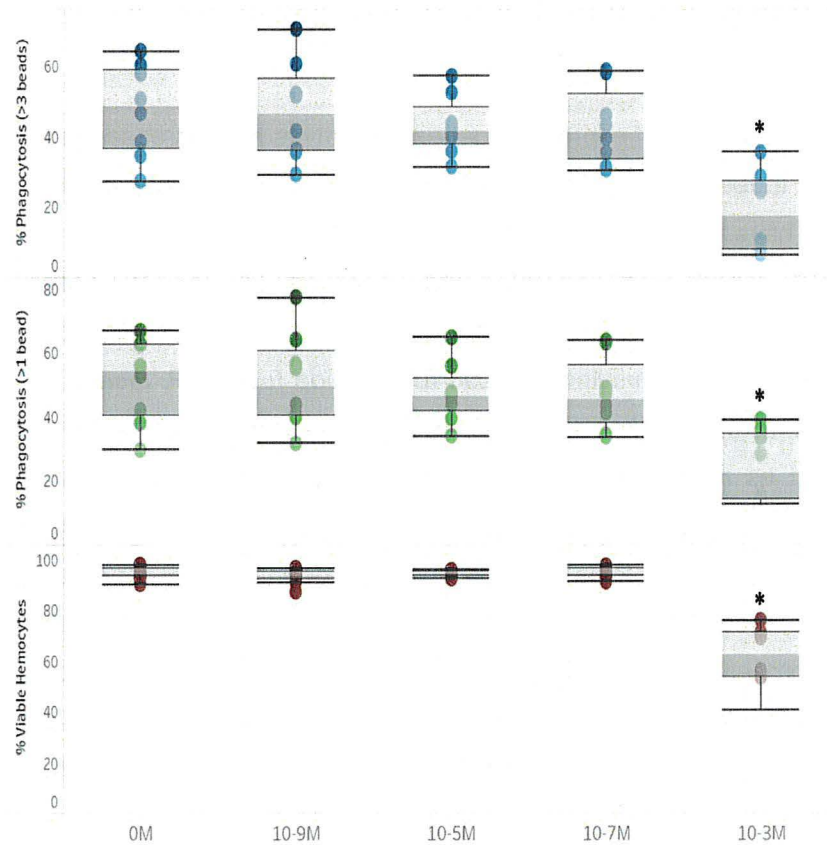


Figure 1 : Percentage of viability and phagocytosis of *M. edulis* hemocytes exposed to different concentrations of Cd ranging from 0 to  $10^{-9}$  M. \* statistical difference with p-value <0.05 for cell viability, 1 and more beads and 3 and more beads.

Tableau 1: The descriptive statistics of the *M. edulis* hemocytes transcriptome

<b>Transcriptome Statistic</b>	<b>Results</b>
Nb. Transcripts	352976
Nb. Components	189422
Total Transcripts Length (bp)	249731063
Mean Transcript Length (bp)	707,5015383
Median Transcript Length (bp)	419
Min. Transcript Length (bp)	224
Max. Transcript Length (bp)	32352
N50 (bp)	1041
GC %	34,07502013

### 2.3.3 Overview of *M. edulis* transcriptome

Even though the knowledge of expressed genes in bivalves has increased in the past few years, it remains limited. Indeed, only 382,612 ESTs, 32,219 annotated genes and 47,120 proteins from the class Bivalvia have been deposited in NCBI (12/08/2016). Out of a total of 189,422 assembled transcripts, 45,647 contigs were annotated with 43,905 (23.2% of all the assembled transcripts) having an e-value lower than  $1e5$ . The blastX hit data showed that 37,223 contigs corresponded to *C. gigas*, 1366 to *M. galloprovincialis*, 298 to *Pinctada fucata* (*P. fucata*), and 197 to *Mytilus coruscus* (*M. coruscus*). Based on the gene ontology (GO) analysis, 32% of the annotated contigs were represented as molecular functions, 52% as biological processes and 16% as cellular component (Fig. 2). For the molecular function terms, catalytic activity (38.8%) was the dominant group followed by binding proteins (30.1%) and antioxidant activity represented 0.4%. For the biological process, metabolic process was the dominant GO terms (35%), response to stimulus; immune system process and apoptotic process represented 4.9%, 2.1% and 1.3% respectively. For the cellular component, cell part was the most representative term with 41.9% (Fig. 2). KO identifiers (K numbers) were used to classify and identify molecular level function available in KEGG database.

Out of 43,905 transcripts annotated, K numbers were assigned to 20,256 transcripts representing 5228 unique K numbers. The generated K numbers were mainly represented by proteins involved into RNA messenger biogenesis (147 hits), DNA repair and recombination (166 hits), protein kinases (145 hits) and ubiquitin system (122 hits). The main identified pathways were the metabolic process (ko01100) with 748 hits, followed by biosynthesis of secondary metabolites (ko01110) with 240 hits. Phagocytosis related-pathway constituting phagosome pathway (ko04145) was found in 47 positions with 49 hits (Fig. 3).

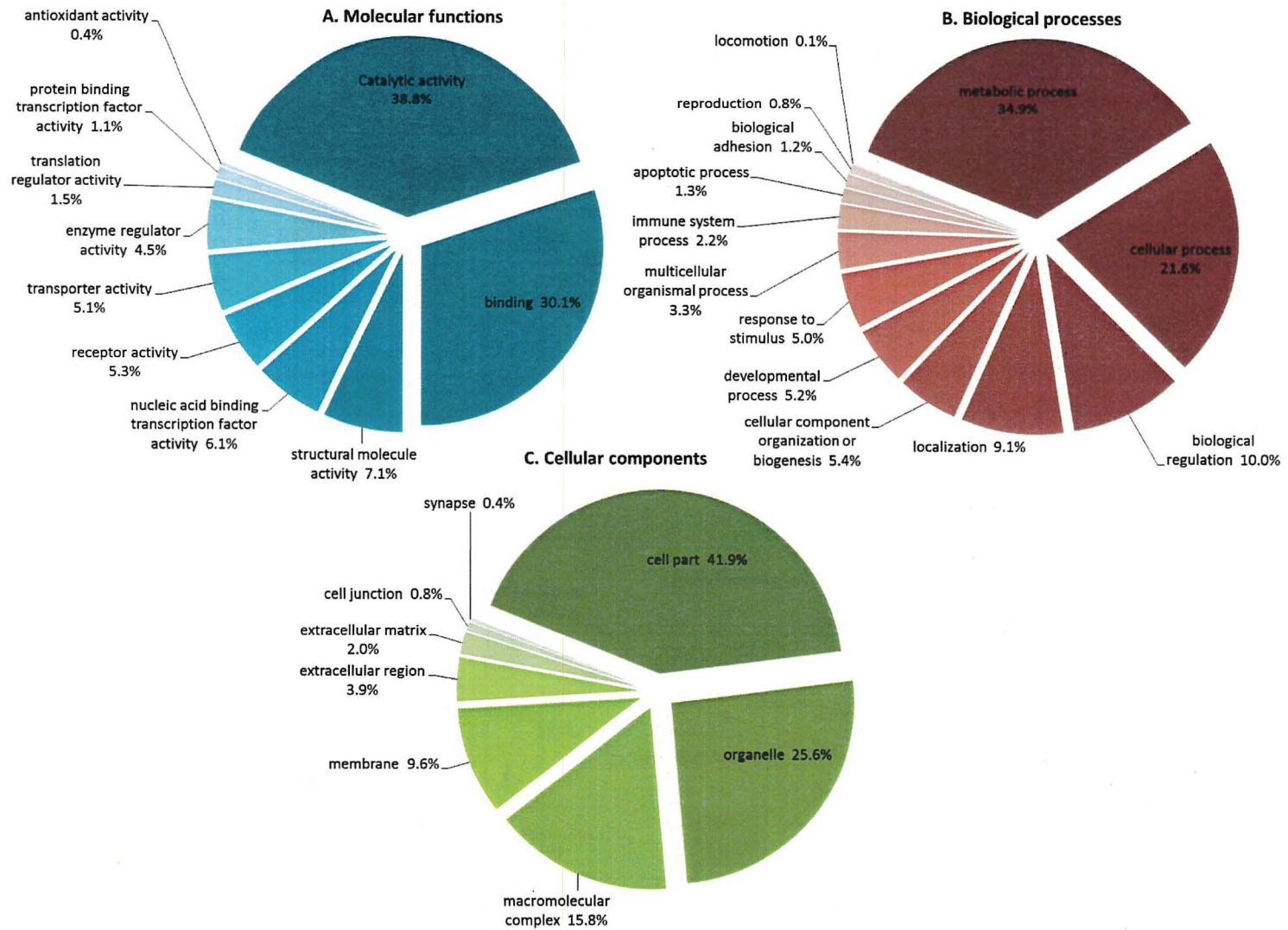


Figure 2 : Functional annotation of assembled sequences based on gene ontology (GO) categorization.



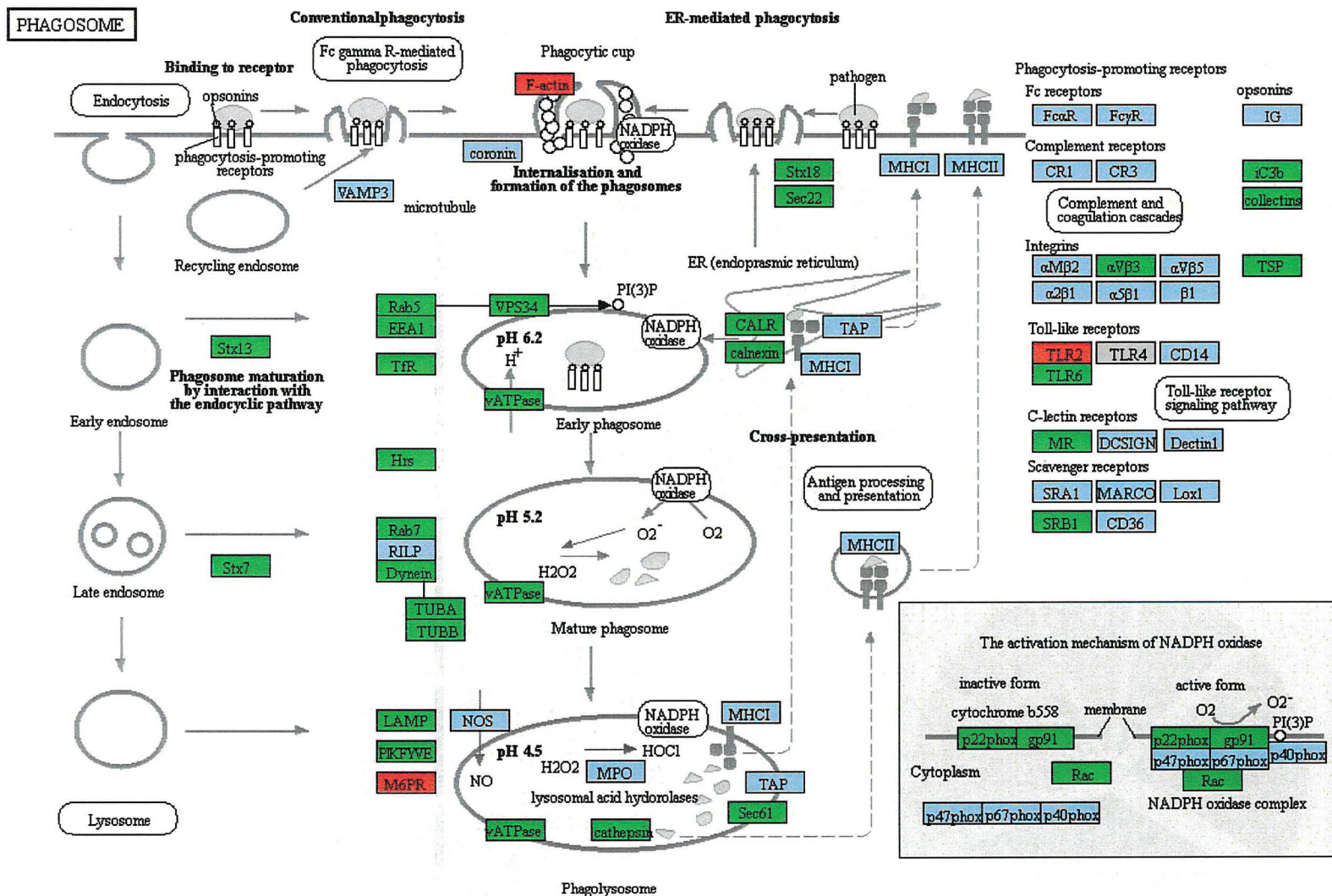


Figure 3: Phagosome pathways (ko04145): green squares represent gene present in the whole transcriptome. Grey squares represent under-expressed genes and red ones represent over-expressed genes (comparing exposed cells (10<sup>-3</sup>M) and non-exposed cells (0M))

### 2.3.4 Differential gene expression analysis

Differential gene expression (DGE) between non-exposed (0 M) and Cd-exposed ( $10^{-3}$  M) hemocytes was performed using the edgeR package. Distribution of the biological replicates was investigated [30] and analysis showed that treated (in red) and untreated samples (in black) are distinctly clustered (Fig. 4A). DGE analysis was performed on 117,290 contigs out of a total 1112 with 84 downregulated and 1028 up-regulated (Fig. 4B). The heatmap analysis showed that treated and non-treated replicates are two distinct clusters represented by the control and the exposed samples (Fig. 4C). Three differentially expressed groups of genes have been identified based on the heatmap analysis. BlastX analysis showed that 664 out of 1112 contigs have been annotated when BlastX was performed against GenBank database (Table S1). DGE annotated contigs were represented as 18.82% of uncharacterized protein, 2.26% of HSP, 1.65% and 1.5% of IAP1 and XIAP respectively and 0.9%, 0.75% and 0.75% of HS24M, BIRC3 and HELZ2 respectively. The most over and under-expressed genes were H5p (Log\_FC = 11.307) and GLGB (alpha-glucan-branching enzyme, log\_FC. 11.046), respectively. To identify the molecular mechanisms by which hemocytes genes were differentially regulated, all expressed genes were mapped to the KEGG database. Data showed that 371 had a KO number which represented 270 unique KO. Therefore, 244 different KEGG pathways were identified with 31 hits for metabolic process (ko01100), 11 hits for lysosome (ko04142) and protein processing in endoplasmic reticulum (ko04141). Phagosome and apoptotic pathways had 4 and 8 hits respectively.

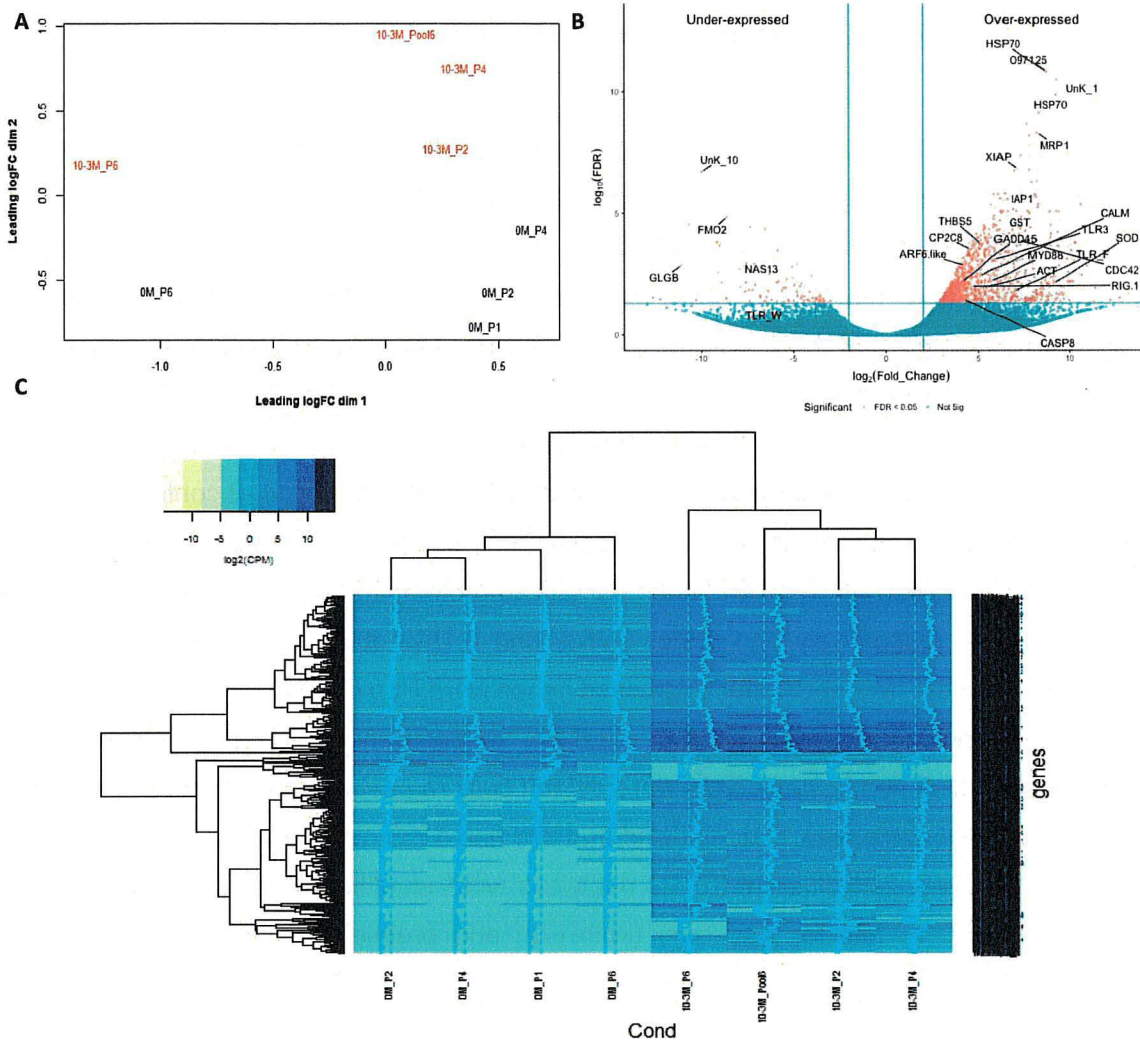
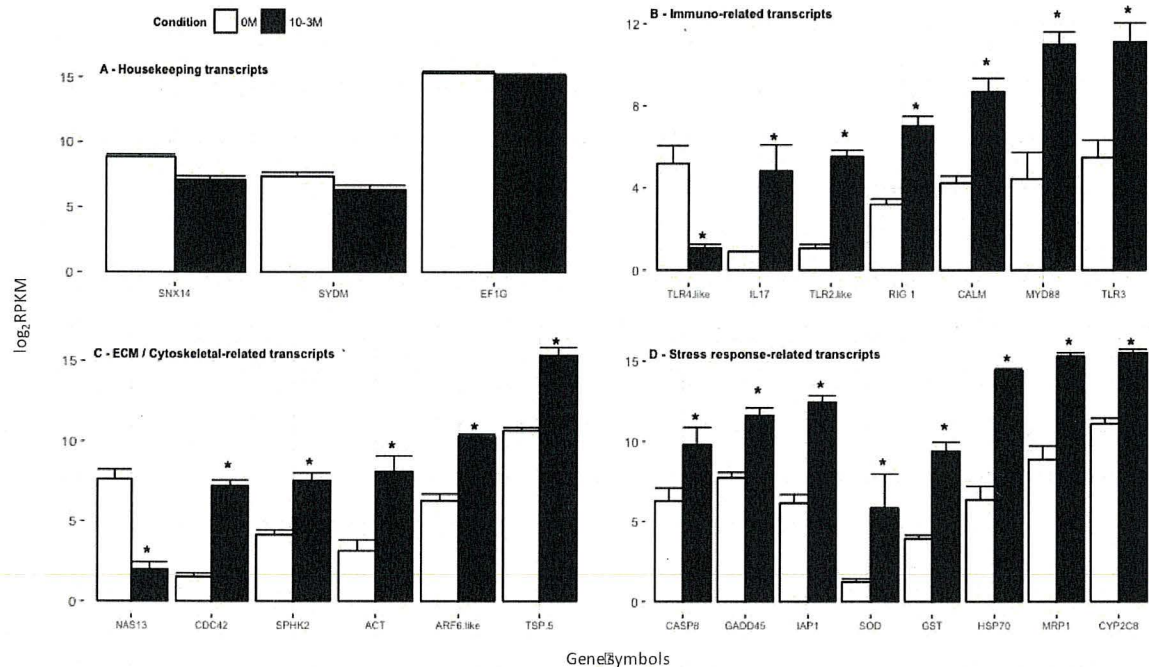


Figure 4: DGE analysis. A. Sample distribution based on Euclidean distance (red: Cd-exposed cells and blue: non-exposed cells). B. Volcano plot of transcripts based on the LogFC and FDR with symbol of the most significantly expressed genes (UnK\_10, FMO2, GLGB, 097125, UnK\_1) and regulated genes studied here (blue dots represent genes non-significantly expressed and red dots represents significantly Cd-regulated genes, UnK = unknown transcript, for gene symbol, referred to Table S1). C. Heatmap of the 1112 expressed genes extracted from the volcano plot.



### 2.3.5 Phagocytosis-related genes and biomarkers

RNA-seq analysis enables to explore a huge amount of genes involved in multiple cell pathways. In this study, we have focused our interested on transcripts differentially expressed involved in mussels' immune systems. We have also selected three housekeeping genes (Fig. 5-A) to validate our model.



**Figure 5: Gene expression in  $\log_2(\text{RPKM})$  of A-Housekeeping genes, B-Immuno-related transcripts, C- ECM / Cytoskeletal-related transcripts and D- Stress responses-related transcripts (\* = statistical difference between 0M and  $10^{-3}\text{M}$ , with a p-value  $< 0.05$ , Mean  $\pm$  SD; abbreviation: RPKM = read per kilobase million, ECM = extracellular protein matrix).**

$\text{Cd}^{2+}$  uses calcium channels to enter into the cells. Furthermore, it can bind to membrane receptors using  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites through calmodulin (Calm) proteins. In marine invertebrates, the roles and functions of calm-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  were reported in mussels [31] and oysters [32,33]. Recently, it was shown that the expression of Calm gene increased after exposure of oysters' hemocytes to 10 and 25 mg/L of zinc and 5, 25, 50 mg/L of Pb [34]. In our study, Calm mRNA level in the blue mussel hemocytes was higher after exposure to  $10^{-3}\text{M}$  Cd (112.41 mg of  $\text{Cd}^{2+}$  per L1) (Fig. 5-B). Changes in the expression of Calm gene due to metal exposure can also interfere with the cytoskeletal architecture due to the interaction between Calm and actin molecules, which play a key role in the phagocytosis activities of hemocytes [34,35].

In bivalves, the phagocytosis invoked specific membrane receptors known as pattern recognition receptors (PRRs).

Four PRRs were identified TLR2-like, TLR4-like, TLR3 and RIG-1. TLR2-like and TLR4-like are part of phagosome pathways (Fig. 4). TLR2, TLR 3 and RIG-1 were overexpressed in cells exposed to  $10^{-3}$  M of Cd, while TLR4-like was under-expressed (Fig. 5-B). TLRs play key roles in detecting non-self-antigens and immune system activation. The interaction between TLRs and metals is not well described. However, in a recent study, Balbi et al. [36] have shown a decrease of TLR isoform gene expression in *M. galloprovincialis* exposed to 100 mg/L of Cd associated to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. Furthermore, Meng et al. [37] have observed differential expression of TLR (TLR1 to 4 and TLR7/8) gene and a down-regulation of RIG-I in *Mizuhopecten yessoensis* (*M. yessoensis*) gills exposed to 0.1 mg/L of copper. Although several studies have shown the effects of metal-based nanoparticles on innate immunity via TLR signalling pathways [38,39], to the best of our knowledge, no study has been performed on the effect of Cd on TLR gene expression. Furthermore, TLRs activate cell-signalling cascades through MyD88 (myeloid differentiation primary response 88)-dependent and MyD88-independent pathways resulting in the induction of various cytokines such as TNF and interleukin (such as IL-17 e Fig. 5-B) [40,41]. Several transcripts involved in MYDD88-dependent pathways have been identified in our libraries such as DRP1, CREB, IAPs, CAS8 and MYD88 (Fig. 5-B and D). Once PRR have recognized PAMPs or foreign bodies, immune cells migrate towards them. This step involves hemocytes migration, increase in ion transport membrane activity, focal adhesion formation sites composed of extracellular matrix protein (ECM) and cytoskeletal reorganization. In our study, TSP-5 (also known as cartilage oligomeric matrix protein COMP or THBS5), a calcium binding protein that interacts with ECM components [42] was found to be modulated by Cd (THBS5: log<sub>2</sub>(RPKM) = 15.5 for Cd exposed cells against 10.9 for non-exposed). Another matrix protein, NAS13, was found to be regulated by Cd. NAS13, is a metalloprotease from the matrix metalloproteinases (MMPs) family, that plays pivotal roles in cell differentiation and motility, as well as in inflammation and wound healing [43,44]. It possesses an ion binding site and its activity is regulated by divalent ions such as Zn<sup>2+</sup> or Ca<sup>2+</sup>. (which could be displayed by Cd<sup>2+</sup>.) [43]. Our results showed that Cd down-regulated NAS13 gene expression. In sea urchins, it has been shown that MMPs activities were partially inhibited in presence of 10 mM of Mg<sup>2+</sup>. [45]. It has been suggested that molluscan hemocytes may be involved in ECM deposition and remodeling. Therefore, MMPs could be modulated by endogenous factors involved in inflammatory response such as cytokines and growth factors [43,46,47].



After cell migration, phagocytosis is initiated, thus activating actin-dependent cytoskeletal changes. Actin polymerization is responsible for the formation of pseudopod protrusions around the pathogens [48].

Previous studies showed that mussel hemocytes lose their pseudopodia when exposed to 100 mM of Cd [49]. Therefore, our results confirm previous findings.

In presence of Cd, Act was found to be overexpressed (Fig. 5-C). It has been suggested that metals such as Cd and Cu could bind directly to cytoskeletal proteins followed by their denaturation [50]. The creation and maturation of phagosome is the next step of phagocytosis (Fig. 3). Rho proteins, such as CDC42, are involved into phagosome maturation and formation pathogen clearance [51,52]. Even though the role of CDC42 in phagocytic activities in bivalve hemocytes has not been described, it has been speculated that CDC42 regulates several processes during phagocytosis such as pseudopod extension and its activation during phagocytosis [53]. In our study, CDC42 was over-expressed in Cd-exposed cells compared to non-exposed cells (Fig. 5-C). Furthermore, CDC42 plays a main role in different immune-related functions such as activation of Fcγ receptor (FcγR)-mediated phagocytosis, PI 3- kinase pathway, and activation of JNK and p38 MAP kinases. Ding et al. [54], found that many transcripts are involved in that pathway in scallops' cells suggesting that these genes seem to be present in mollusk. Besides, CDC42 has been shown to activate PAK kinases indicating that GTP-binding proteins may have a role in mediating signalling pathways related to JNK and/or p38 MAP kinases [55]. In our study, several members of the Fc-gamma R-mediated phagocytosis pathways have been identified such as CDC42, PKDC, SPHK and ARF6 (Fig. 5-C). Peng et al. [56] have shown that CDC42 was activated in shrimp after 6 h of exposure to 8.50 mM of Cd<sup>2+</sup>. Shrimps lacking CDC42 did not express MAPKs after 24 h of Cd exposure and CDC42-suppressed cells expressed more cells mortality and inhibition of MAPK pathways, [56]. The authors suggested that CDC42 might play a very important role in apoptosis regulation in shrimp. Similarly, in our study, we have found CDC42 to be overexpressed in cells presenting less phagocytosis and strong cell death. We can hypothesize that cells exposed to Cd stopped their phagocytosis function and induced apoptosis cell death.

We have shown the effects of Cd on hemocytes phagocytic function through gene expression modulation but to validate our model, traditional markers (involved in DNA damage, apoptosis and stress responses) used in metal exposure were also investigated. It is well known that Cd is a genotoxic compound that damages DNA [57,58]. In *M. yessoensis* [59] and *Corbicula japonica* (*C. japonica*) [60] the level of DNA damage was higher in gill cells exposed to 0.3 mg/L Cd for 4 days.



DNA damage then leads to the induction of DNA repair genes such as GADD45 or pro-apoptosis genes such as CAS8 [61]. In this study, GADD45 was over-expressed in cells exposed to Cd ( $\log_2$  (RPKM) = 8.2 for non-exposed and  $\log_2$  (RPKM) = 11.5 for Cd-exposed cells). The growth arrest and DNA damage inducible gene (GADD45) is activated by UV radiations, chemotherapeutic agents and growth factors [62]. It participates in nuclear excision repair (NER) [62].

In response to DNA damage, GADD45 plays an important role in repairing DNA [63,64] and it is an important cell cycle checkpoint protein that arrests the cell cycle [65] to avoid proliferation of mutated cells. However, if the damage cannot be repaired, cells will undergo apoptosis. Caspase 8 (CAS8), an apoptotic initiator that cleaves and activates caspase effectors (caspase 3, 6 and 7) [66], was over-expressed in cells exposed to Cd ( $\log_2$  (RPKM) = 10.4 and  $\log_2$  (RPKM) = 6.4 for non-exposed cells). CAS8 is an initiator and an essential component of the extrinsic cell death pathway initiated by TNF family members [37]. In response to the activation of the TNF family death receptors, CAS8 is recruited by death-inducing signalling complex mechanisms [37,67,68]. In vertebrates, it has been shown that Cd exposure resulted in apoptosis in a variety of cell types [69,70]. To regulate apoptosis, a number of anti-apoptotic proteins has been found among which IAP1 (Fig. 5-D). IAP1 proteins contribute significantly to cell death regulation by suppressing apoptosis, activating death receptors, promoting mitochondrial permeability and influencing other mediators of apoptosis [71]. Apoptotic process in mollusks is well described by Refs. [66,72]. In *M. galloprovincialis* [67] and in *C. gigas* [73], it has been shown that apoptosis is induced during phagocytosis and metals exposure.

It is well documented that Cd induces the expression of genes involved in stress such as heat shock proteins (HSP), glutathione-S-transferase (GST), and genes involved in oxidative stress response such as SOD [74]. Previous studies showed that SOD and GST gene expression levels were used as biomarkers in mussels [75,76] and their expression was modulated in bivalves and fish after Cd treatment [77]. In this study, expression levels of SOD and GST gene were higher in hemocytes exposed to Cd (Fig. 5-D). Fang et al. [77] showed similar results in clams after 7 days of Cd exposure and Koutsogiannaki et al. [78] observed an up-regulation of SOD gene expression in *M. galloprovincialis* cells exposed to 5 mM of Cd for 30 min. GST was also up-regulated when cells were exposed to 200 mg/L [79]. The decrease of cell phagocytosis and viability when exposed to  $10^{-3}$  M Cd could be the cell response to the increase of ROS and oxidative stress. We can stipulate that hemocytes overexpress SOD and GST genes to protect themselves against the Cd toxicity. Cells can also reduce Cd toxicity by purging or transforming it using different proteins such as ABC transporter or CYP proteins [80,86].

A recent study has identified and classified most of molluscan CYP sequences into CYP1, CYP2 and CYP2-like groups, which are involved in xenobiotic response mechanisms [80,81]. In different scallop tissues, *M. yessoensis*, nine transcripts corresponding to CYP450 were up-regulated in presence of Cd [82], while in Manila clams exposed to multiple contaminants, CYP2C8 was up-regulated in the digestive gland [83]. In this study, CYP2C8 was up-regulated in cells exposed to Cd ( $\log_2$  (RPKM) = 15.5) in comparison to the control ( $\log_2$  (RPKM) = 11.5).

To the best of our knowledge, no study has shown a differential regulation of CYP2C8 gene by metals specifically in bivalve hemocytes. ABC transporters encode the MXR/MDRs, a superfamily of transporters responsible for the transport of a wide variety of compounds across biological membranes [85]. The role of ABC transport proteins in Cd disposition/resistance has been recently suggested in fish and invertebrate models [86]. MRP1 is part of the multi xenobiotic resistance proteins (MRX), which play a key role in the chemical detoxification system including heavy metals, such as arsenite, antimony and Cd [87]. For instance, Della Torre et al. [86] showed that abcc-like/MRP1 was upregulated in *M. galloprovincialis* hemocytes exposed to 0.4 mM of Cd. In this study, expression of MRP1 was two times higher in Cd-exposed hemocytes ( $\log_2$  (RPKM) = 15) than in non-exposed hemocytes ( $\log_2$  (RPKM) = 8). It has been found that MRP1 are more expressed in hemocytes probably due to the high number of lysosomes. A very high MXR activity has been found in hemocyte lysosomes, where large amounts of metals such as Cd are accumulated for the subsequent excretion of the metal-rich residual bodies [84,88]. It has been suggested that intracellular MXR transports metals ion into lysosomes to be accumulated and stored in order to reduce their toxicity. HSP70, a cytosolic protein induced by multiples factors as thermal stress, metal contamination, and bacterial infection was used as a marker in several biomonitoring studies [89]. In immune systems, HSP70 maintains phagocytic cell integrity either by repairing damage or safeguarding against autolysis and apoptosis. Most commonly, HSP70 gene in bivalve mollusks is up-regulated by exposure to low-level concentrations of metals [90]. Taylor et al. [90] observed an over-expression of HSP70 in hemocytes of oysters exposed to 100 mg/L of CdCl<sub>2</sub> for 24 h. In our study, HSP70 was up regulated in hemocytes exposed to 10<sup>-3</sup> M of Cd ( $\log_2$  (RPKM) = 15 for exposed-cells and 6.25 for non-exposed cells). This is in agreement with previous findings in which HSPs mRNA levels increased in scallops exposed to 0.05, 0.1, or 0.2 ppm Cd for 20 days.

## 2.4 Conclusion

In this study, an *in vitro* model was investigated to assess the effects of Cd on hemocyte phagocytosis and the regulation of molecular pathways. Our model showed that Cd at a concentration of  $10^{-3}$  M decreased the phagocytic ability of cells and induced their mortality. Transcriptome analysis showed that several genes were up-regulated by Cd such as TLRs, NAS13, actin or RIG-I. Genes such as GST, HSP70, SOD commonly used as biomarkers were induced by Cd confirming that hemocytes molecular pathways were indeed regulated after exposure to Cd. Besides these conventional marker genes, several transcripts involved in phagocytosis and apoptosis were identified as regulated by Cd. This model provides a comprehensive understanding of the main molecular mechanisms affected by the exposure of hemocytes to Cd. Therefore, these transcripts could be used as potential additional markers to monitor the health status of blue mussels in aquatic systems facing metal contamination exposure.

### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Genome Quebec Innovation Centre supported by Genome Canada. This study was funded by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC STPGP 430539-2012) Strategic Grant.

### APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found at:  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.001>



## 2.5 References

1. Evariste, L., Rioult, D., Brousseau, P., Geffard, A., David, E., Auffret, M., Fournier, M. and Betoulle, S. Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2017, (137), 78-85.
2. Thévenod, F. Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be? *Toxicology & Applied Pharmacology*. 2009, 238, (3) 221-239 doi:10.1016/j.taap.2009.01.013.
3. Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D. and Duchemin, M.A Multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in western mediterranea. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2006, 63, (3) 393-405 doi:<http://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.ecoenv.2005.10.016>.
4. Apeti, D. A., Lauenstein, G. G., Christensen, J. D., Kimbrough, K., Johnson, W. E., Kennedy, M. and Grant, K. G. A historical assessment of coastal contamination in birch harbor, maine based on the analysis of mussels collected in the 1940s and the mussel watch program. *Mar Pollut Bull*. 2010, 60.
5. Venier, P., Varotto, L., Rosani, U., Millino, C., Celegato, B., Bernante, F., Lanfranchi, G., Novoa, B., Roch, P., Figueras, A. and Pallavicini, A. Insights into the innate immunity of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics*. 2011, 12, (1) 69-87 doi:10.1186/1471-2164-12-69.
6. Kimbrough, K. L., Johnson, W. E., Lauenstein, G. G., Christensen, J. D. and Apeti, D. A. An assessment of two decades of contaminant monitoring in the nation's coastal zone. NOAA Technical Memorandum (NOS NCCOS 74). 2008. Silver Spring, MD, U.S.
7. Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C. and Moraga, D. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine Environmental Research*. 2002, 54, (3-5) 585-589 doi:[http://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/S0141-1136\(02\)00120-4](http://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/S0141-1136(02)00120-4).
8. Yao, C. and Somero, G. N. Thermal stress and cellular signaling processes in hemocytes of native (*Mytilus californianus*) and invasive (*Mytilus galloprovincialis*) mussels: Cell cycle regulation and DNA repair. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 2013, 165, 159-168 doi:10.1016/j.cbpa.2013.02.024.
9. Allam, B. and Raftos, D. Review: Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2015, 131, 121-136 doi:10.1016/j.jip.2015.05.005.

10. Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006, 124, (4) 783-801 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.
11. Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011, 30, (1) 16-34 doi:10.3109/08830185.2010.529976.
12. Gerdol, M. and Venier, P. An updated molecular basis for mussel immunity. *Fish & Shellfish Immunology*. 2015, (0) doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.013>.
13. Edwards, D. J. and Holt, K. E. Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. *Microbial Informatics and Experimentation*. 2013, 3, (1) 1-9 doi:10.1186/2042-5783-3-2.
14. Moreira, R., Pereiro, P., Canchaya, C., Posada, D., Figueras, A. and Novoa, B. RNA-seq in *Mytilus galloprovincialis*: Comparative transcriptomics and expression profiles among different tissues. *BMC Genomics*. 2015, 16, (1) 1
15. Moreira, R., Balseiro, P., Planas, J. V., Fuste, B., Beltran, S., Novoa, B. and Figueras, A. Transcriptomics of in vitro immune-stimulated hemocytes from the manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing. *PLoS One*. 2012, 7, doi:10.1371/journal.pone.0035009.
16. Xu, M., Jiang, L., Shen, K., Wu, C., He, G. and Hsiao, C. Transcriptome response to copper heavy metal stress in hard-shelled mussel (*Mytilus coruscus*). *Genomics Data*. 2016, 7, 152-154 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.gdata.2015.12.010>.
17. Venier, P., De Pittà, C., Pallavicini, A., Marsano, F., Varotto, L., Romualdi, C., Dondero, F., Viarengo, A. and Lanfranchi, G. Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2006, 602, (1-2) 121-134 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.08.007>.
18. LeBlanc, N., Landry, T., Stryhn, H., Tremblay, R., McNiven, M. and Davidson, J. The effect of high air and water temperature on juvenile *M. edulis* in Prince Edward Island, Canada. *Aquaculture*. 2005, 243, (1-4) 185-194 doi:<http://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.aquaculture.2004.09.035>.
19. Brousseau, P. (1999). *Manual of immunological methods*. CRC Press; Boca Raton.
20. Sauv e, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Sen cal, L., Goudreau, P. and Fournier, M. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: In vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology*. 2002, 58, (3-4), 189-200. doi: [http://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00232-6](http://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00232-6)

21. Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H. and Fournier, M. 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*. 2000, 142, (2) 145-156
22. Bolger, A. M., Lohse, M. and Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014, 30, (15) 2114-2120 doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
23. Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., Henschel, R., LeDuc, R. D., Friedman, N. and Regev, A. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq: Reference generation and analysis with Trinity. *Nature Protocols*. 2013, 8, (8) 10.1038/nprot.2013.084 doi:10.1038/nprot.2013.084.
24. Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N. and Regev, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat Biotech*. 2011, 29, (7) 644-652
25. Li, B. and Dewey, C. N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 2011, 12, 323-2105-12-323 doi:10.1186/1471-2105-12-323 [doi].
26. Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. and Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq. *Nature Methods*. 2008, 5, (7) 621-628 doi:10.1038/nmeth.1226.
27. Franchi, N. and Ballarin, L. Influence of cadmium on the morphology and functionality of hemocytes in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2013, 158, (1) 29-35 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.04.003>.
28. Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H. and Renault, T. In vitro effects of cadmium and mercury on pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*. 2004, 16, (4) 501-512 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2003.08.007>.
29. Sauv e, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Sen cal, L., Goudreau, P., and Fournier, M. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: In vitro exposure of hemocytes



- to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology*. 2002, 58, (3–4) 189-200  
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00232-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00232-6).
30. Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W. and Smyth, G. K. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*. 2015, 43, (7) e47-e47
31. Stommel, E. W. and Stephens, R. E. Cyclic AMP and calcium in the differential control of *Mytilus* gill cilia. *Journal of Comparative Physiology A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. 1985, 157, (4) 451-459
32. Li, S., Xie, L., Ma, Z. and Zhang, R. cDNA cloning and characterization of a novel calmodulin-like protein from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Febs Journal*. 2005, 272, (19) 4899-4910
33. Cameron, J. N. Unusual aspects of calcium metabolism in aquatic animals. *Annual Review of Physiology*. 1990, 52, (1) 77-95
34. Taylor, D. A., Nair, S. V., Thompson, E. L. and Raftos, D. A. Dose-dependent effects of metals on gene expression in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Environmental Toxicology*. 2015, 30, (9) 989-998
35. Kakiuchi, S. and Sobue, K. Control of the cytoskeleton by calmodulin and calmodulin-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 1983, 8, (2) 59-62  
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004\(83\)90391-2](http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004(83)90391-2).
36. Balbi, T., Smerilli, A., Fabbri, R., Ciacci, C., Montagna, M., Grasselli, E., Brunelli, A., Pojana, G., Marcomini, A., Gallo, G. and Canesi, L. Co-exposure to n-TiO<sub>2</sub> and Cd<sup>2+</sup> results in interactive effects on biomarker responses but not in increased toxicity in the marine bivalve *M. galloprovincialis*. *Science of the Total Environment*. 2014, 493, 355-364  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.146>.
37. Meng, X., Tian, X., Liu, M., Nie, G., Jiang, K., Wang, B. and Wang, L. The transcriptomic response to copper exposure by the gill tissue of Japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) using deep-sequencing technology. *Fish & Shellfish Immunology*. 2014, 38, (2) 287-293  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.03.009>.
38. Luo, Y., Chang, L. W., and Lin, P. Metal-based nanoparticles and the immune system: Activation, inflammation, and potential applications 2015
39. Cui, Y., Liu, H., Zhou, M., Duan, Y., Li, N., Gong, X., Hu, R., Hong, M. and Hong, F. Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2011, 96, (1) 221-229

40. Takeda, K. and Akira, S. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*. 2004, 16, (1) 3-9 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2003.10.003>.
41. Rauta, P. R., Samanta, M., Dash, H. R., Nayak, B., and Das, S. Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: Signaling pathways, expressions and immune responses. *Immunology Letters*. 2014, 158, (1-2) 14-24.
42. Tan, K. and Lawler, J. The interaction of thrombospondins with extracellular matrix proteins. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2009, 3, (3-4) 177-187 doi:10.1007/s12079-009-0074-2.
43. Mannello, F., Canesi, L., Gazzanelli, G. and Gallo, G. Biochemical properties of metalloproteinases from the hemolymph of the mussel *Mytilus galloprovincialis* lam. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*. 2001, 128, (3) 507-515 doi:S1096495900003523.
44. Lacorte, L. M., Rinaldi, J. C., Justulin Jr., L. A., Delella, F. K., Moroz, A. and Felisbino, S. L. Cadmium exposure inhibits MMP2 and MMP9 activities in the prostate and testis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015, 457, (4) 538-541 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.019>.
45. Robinson, J. J. Characterization of a metalloproteinase: A late stage specific gelatinase activity in the sea urchin embryo. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1997, 66, (3) 337-345 doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19970901)66:33.0.CO;2-Q.
46. Muñoz, P., Vance, K. and Gómez-Chiarri, M. Protease activity in the plasma of american oysters, *Crassostrea virginica*, experimentally infected with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Journal of Parasitology*. 2003, 89, (5) 941-951 doi:10.1645/GE-3126.
47. Knorr, E., Schmidtberg, H., Vilcinskas, A. and Altincicek, B. MMPs regulate both development and immunity in the tribolium model insect. *PLoS ONE*. 2009, 4, (3) e4751
48. May, R. C. and Machesky, L. M. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*. 2001, 114, (Pt 6) 1061-1077
49. Gómez-Mendikute, A. and Cajaraville, M. P. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel hemocytes. *Toxicology in vitro*. 2003, 17, (5) 539 doi:10.1016/S0887-2333(03)00093-6.
50. Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D. M. and Marin, M. G. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*.

- Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2001, 41, (2) 163-170  
doi:10.1007/s002440010234.
51. Li, X., Wang, R., Xun, X., Jiao, W., Zhang, M., Wang, S., Wang, S., Zhang, L., Huang, X., Hu, X. and Bao, Z. The Rho GTPase family genes in *Bivalvia* genomes: Sequence, evolution and expression analysis. *PLoS One*. 2015, 10, (12) e0143932  
doi:10.1371/journal.pone.0143932.
  52. Nayak, R. C., Chang, K., Vaitinadin, N. and Cancelas, J. A. Rho GTPases control specific cytoskeleton-dependent functions of hematopoietic stem cells. *Immunological Reviews*. 2013, 256, (1) doi:10.1111/imr.12119.
  53. Hoppe, A. D. and Swanson, J. A. Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis. *Molecular Biology of the Cell*. 2004, 15, (8) 3509-3519  
doi:10.1091/mbc.E03-11-0847
  54. Ding, J., Zhao, L., Chang, Y., Zhao, W., Du, Z. and Hao, Z. Transcriptome sequencing and characterization of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* from different shell color lines. *PLoS One*. 2015, 10, (2) e0116406 doi:10.1371/journal.pone.0116406.
  55. Bagrodia, S., Derijard, B., Davis, R. J. and Cerione, R. A. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995, 270, (47) 27995-27998
  56. Peng, T., Wang, W., Gu, M., Xie, C., Xiao, Y., Liu, Y. and Wang, L. Essential roles of Cdc42 and MAPK in cadmium-induced apoptosis in *Litopenaeus vannamei*. *Aquatic Toxicology*. 2015, 163, 89-96  
doi:<http://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.aquatox.2015.03.023>.
  57. Rank, J., Jensen, K., and Jespersen, P. H. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*M. edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2005, 585, (1-2) 33-42  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.04.008>.
  58. Pruski, A. M. and Dixon, D. R. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *M. edulis* L. *Aquatic Toxicology*. 2002, 57, (3) 127-137  
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00192-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00192-8).
  59. Slobodskova, V. V., Zhukovskaya, A. F. and Chelomin, V. P. DNA damage in the gill cells of the marine scallop *Mizuhopecten yessoensis* during anoxic stress and aerobic recovery. *Ocean Science Journal*. 2012, 47, (2) 95-100 doi:10.1007/s12601-012-0010-x.



60. Slobodskova, V., Solodova, E., Slinko, E. and Chelomin, V. Evaluation of the genotoxicity of cadmium in gill cells of the clam *Corbicula japonica* using the comet assay. *Russian Journal of Marine Biology*. 2010, 36, (4) 311-315
61. Rodriguez-Rocha, H., Aracely-Garcia-Garcia, Panayiotidis, M. I. and Franco, R. DNA damage and autophagy. *Mutation Research*. 2011, 711, (1-2) 158-166 doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.03.007.
62. Tamura, R. E., de Vasconcellos, J. F., Sarkar, D., Libermann, T. A., Fisher, P. B. and Zerbini, L. F. GADD45 proteins: Central players in tumorigenesis. *Current Molecular Medicine*. 2012, 12, (5) 634-651
63. Rosemary Siafakas, A. and Richardson, D. R. Growth arrest and DNA damage-45 alpha (GADD45 $\alpha$ ). *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009, 41, (5) 986-989 doi:10.1016/j.biocel.2008.06.018.
64. Ruiz, P., Orbea, A., Rotchell, J. M. and Cajaraville, M. P. Transcriptional responses of cancer-related genes in turbot *Scophthalmus maximus* and mussels *M. edulis* exposed to heavy fuel oil no. 6 and styrene. *Ecotoxicology*. 2012, 21, (3) 820-831 doi:10.1007/s10646-011-0843-6.
65. Martín-Gómez, L., Villalba, A., Carballal, M. J. and Abollo, E. Identification of relevant cancer related-genes in the flat oyster *ostrea edulis* affected by disseminated neoplasia. *Marine Biotechnology*. 2013, 15, (2) 159-174 doi:10.1007/s10126-012-9472-1.
66. Kiss, T. Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis*. 2010, 15, (3) 313-321 doi:10.1007/s10495-009-0446-3.
67. Romero, A., Estévez-Calvar, N., Dios, S., Figueras, A. and Novoa, B. New insights into the apoptotic process in mollusks: characterization of caspase genes in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS ONE*. 2011, 6, (2) e17003
68. Xiang, Z., Qu, F., Qi, L., Zhang, Y., Tong, Y. and Yu, Z. Cloning, characterization and expression analysis of a caspase-8 like gene from the Hong Kong oyster, *Crassostrea hongkongensis*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2013, 35, (6) 1797-1803 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.08.026>.
69. Fuente, H. D. L., Portales-Pérez, D., Baranda, L., Díaz-Barriga, F., Saavedra-Alanís, V., Layseca, E. and González-Amaro, R. Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells. *Clinical & Experimental Immunology*. 2002, 129, (1) 69-77 doi:10.1046/j.1365-2249.2002.01885.x.

70. Fujimaki, H., Ishido, M. and Nohara, K. Induction of apoptosis in mouse thymocytes by cadmium. *Toxicology Letters*. 2000, 115, (2) 99-105 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(00\)00178-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(00)00178-8).
71. Zhang, L., Li, L. and Zhang, G. Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Developmental & Comparative Immunology*. 2011, 35, (5) 603-610 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.01.005>.
72. Sokolova, I. Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebrate Survival Journal*. 2009, 6, 49-58
73. Terahara, K., Takahashi, K. G. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. *Current Pharmaceutical Design*. 2008, 14, (2) 131-137
74. Joseph, P. Review: Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009, 238, 272-279 doi:10.1016/j.taap.2009.01.011.
75. Bigot, A., Minguez, L., Giambérini, L. and Rodius, F. Early defense responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: Transcriptional and histochemical studies. *Environmental Toxicology*. 2011, 26, (6) 623-632 doi:10.1002/tox.20599.
76. Rola, R. C., Monteiro, M. d. C., Reis, S. R. d. S., Sandrini, J. Z. Molecular and biochemical biomarkers responses in the mussel *M. edulis* collected from southern brazil coast. *Marine Pollution Bulletin*. 2012, 64, (4) 766-771 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.01.004>.
77. Fang, Y., Yang, H., Wang, T., Liu, B., Zhao, H. and Chen, M. Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam *Macra veneriformis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2010, 151, (3) 325-333 doi:<http://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.cbpc.2009.12.005>.
78. Koutsogiannaki, S., Franzellitti, S., Fabbri, E. and Kaloyianni, M. Oxidative stress parameters induced by exposure to either cadmium or 17 $\beta$ -estradiol on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. the role of signaling molecules. *Aquatic Toxicology*. 2014, 146, 186-195 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.005>.
79. Hoarau, P., Damiens, G., Roméo, M., Gnassia-Barelli, M. and Bebianno, M. J. Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C:*

- Toxicology & Pharmacology. 2006, 143, (2) 196-203  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.02.007>.
80. Zanette, J., Jenny, M. J., Goldstone, J. V., Parente, T., Woodin, B. R., Bainy, A. C. D. and Stegeman, J. J. Identification and expression of multiple CYP1-like and CYP3-like genes in the bivalve mollusk *M. edulis*. Aquatic Toxicology. 2013, 128-129, 101-112  
doi:10.1016/j.aquatox.2012.11.017.
81. Zanette, J., Goldstone, J. V., Bainy, A. C., Stegeman, J. J. Identification of CYP genes in *Mytilus* (mussel) and *Crassostrea* (oyster) species: First approach to the full complement of cytochrome P450 genes in bivalves. Marine Environmental Research. 2010, 69 Suppl, S1-3 doi:10.1016/j.marenvres.2009.10.013 [doi].
82. Meng, X., Liu, M., Jiang, K., Wang, B., Tian, X., Sun, S., Luo, Z., Qiu, C. and Wang, L. De novo characterization of Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* transcriptome and analysis of its gene expression following cadmium exposure. PLoS ONE. 2013, 8, (5) e64485 doi:10.1371/journal.pone.0064485.
83. Milan, M., Matozzo, V., Pauletto, M., Di Camillo, B., Giacomazzo, M., Boffo, L., Binato, G., Marin, M. G., Patarnello, T. and Bargelloni, L. Can ecological history influence response to pollutants? Transcriptomic analysis of manila clam collected in different Venice lagoon areas and exposed to heavy metal. Aquatic Toxicology. 2016, 174, 123-133  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.024>.
84. Baker, J. R., Satarug, S., Reilly, P. E. B., Edwards, R. J., Ariyoshi, N., Kamataki, T., Moore, M. R. and Williams, D. J. Relationships between non-occupational cadmium exposure and expression of nine cytochrome P450 forms in human liver and kidney cortex samples. Biochemical Pharmacology. 2001, 62, 713-721 doi:10.1016/S0006-2952(01)00716-X.
85. Leslie, E. M., Deeley, R. G. and Cole, S. P. C. Multidrug resistance proteins: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. Toxicology and Applied Pharmacology. 2005, 204, 216-237 doi:10.1016/j.taap.2004.10.012.
86. Della Torre, C., Bocci, E., Focardi, S. E. and Corsi, I. Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. Marine Environmental Research. 2014, 93, 56-63  
doi:10.1016/j.marenvres.2013.06.005.
87. Della Torre, C., Zaja, R., Loncar, J., Smital, T., Focardi, S. and Corsi, I. Interaction of ABC transport proteins with toxic metals at the level of gene and transport activity in the PLHC-1 fish cell line. Chemico-Biological Interactions. 2012, 198, (1-3) 9-17  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2012.04.008>.



88. Moore, M. N. and Willows, R. I. Pollutant responses in marine organisms. A model for cellular uptake and intracellular behaviour of particulate-bound micropollutants. *Marine Environmental Research*. 1998, 46, (1) 509-514 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00078-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00078-0).
89. Sung, Y. Y. and MacRae, T. H. Heat shock proteins and disease control in aquatic organisms. *Journal of Aquaculture Research & Development*. 2011, S2. doi: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.S2-006>
90. Taylor, D. A., Thompson, E. L., Nair, S. V. and Raftos, D. A. Differential effects of metal contamination on the transcript expression of immune- and stress-response genes in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2013, 178, 65-71 doi:10.1016/j.envpol.2013.02.027.

## **CHAPITRE IV**

### **IDENTIFICATION ET VALIDATION DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES MODULÉS PAR LE CADMIUM (PUBLICATION # 2)**

### **DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION OF M. EDULIS' HEMOCYTES EXPOSED TO CADMIUM (PAPER #2)**

*Article en correction*

## CONTRIBUTION DES AUTEURS

J'ai, Philippine Granger Joly de Boissel à titre de premier auteur, réalisé toutes les expériences présentes dans cette publication. J'ai aussi participé à l'interprétation des résultats et la rédaction de chaque section du manuscrit.

Les Dr. Fournier, Dr. Kibenge et Dr. Siah sont co-auteurs car ils sont à l'origine de la conception du projet. Ils ont aussi participé à la révision de l'article.

Le Dr. St-Pierre a participé l'interprétation des résultats et à la rédaction de l'article et à sa correction.



## 1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

La toxicité du cadmium (Cd) représente une menace importante pour la vie humaine et les écosystèmes aquatique. En raison de sa large répartition géographique et de sa capacité à accumuler des xénobiotiques, *M. edulis* est largement utilisée comme organisme sentinelle pour surveiller la santé des écosystèmes côtiers. Nos études précédentes ont montré que l'exposition *in vitro* des hémocytes de *M. edulis* au Cd inhibait leurs activités phagocytaires. Dans ce travail, nous avons étudié les voies moléculaires associées à ces effets et identifié des marqueurs moléculaires susceptibles d'être utilisés pour surveiller la toxicité du Cd des écosystèmes aquatiques. Plus précisément, nous avons : 1) identifié 12 transcrits dont les niveaux d'expression ont été modulés suite à une exposition au Cd, 2) validé leur expression par RT-qPCR et 3) corrélé leurs niveaux d'expression avec la phagocytose et la viabilité cellulaire. Les 12 transcrits comprenaient trois transcrits associés aux réponses au stress (*SOD*, *HSP70* et *CYP2C8*), trois associés à la réparation des dommages à l'ADN et à l'apoptose (*GADD45*, *XIAP* et *CAS8*), quatre transcrits liés à l'immunité (*TLR2-like*, *TLR3*, *TLR4-like*, *RIG-I* et *NAS13*), et un à la voie dépendante du calcium (*CALM*). Nous avons constaté que les taux d'expression étaient plus élevés pour les gènes *HSP70*, *CYP*, *SOD*, *TLR*, *GADD45* et *XIAP* dans les hémocytes et étaient en corrélation positive avec l'exposition au Cd et inversement corrélés avec la viabilité cellulaire et la phagocytose. D'un point de vue méthodologique, nous avons également constaté que les technologies RT-qPCR et la méthode DGE étaient significativement corrélées et aboutissaient à des modèles d'expression des gènes similaires. En résumé, nous avons identifié une nouvelle signature d'expression génique associée à des fonctions cellulaires altérées dans hémocytes suite à une exposition au Cd. Cependant, d'autres recherches seront nécessaires afin de valider le potentiel de cette signature en tant qu'outil d'évaluation de l'état et de la santé des écosystèmes aquatiques marins.

## 2 ARTICLE

### Differential gene expression of *M. edulis*' hemocytes exposed to cadmium

Authors:

Philippine Granger Joly de Boissel<sup>ab</sup>, Yves St-Pierre<sup>b</sup>, Frederick Kibenge<sup>a</sup>, Michel Fournier<sup>b</sup> and Ahmed Siah<sup>c\*</sup>.

a. Department of Pathology and Microbiology, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, PE C1A 4P3, Canada.

[pdeboissel@upei.ca](mailto:pdeboissel@upei.ca)

[Kibenge@upei.ca](mailto:Kibenge@upei.ca)

b. INRS - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada.

[yves.st-pierre@iaf.inrs.ca](mailto:yves.st-pierre@iaf.inrs.ca)

[Michel.Fournier@iaf.inrs.ca](mailto:Michel.Fournier@iaf.inrs.ca)

c. British Columbia Centre for Aquatic Health Sciences, 871A Island Highway, Campbell River, BC V9W 2C2, Canada

\*Corresponding author: [ahmed.Siah@cahs-bc.ca](mailto:ahmed.Siah@cahs-bc.ca)

## ABSTRACT:

Cadmium (Cd) toxicity represents an important threat to human life and aquatic ecosystems. The development of molecular biomarkers is thus critically needed for long-term monitoring of aquatic organisms' health status. Because of its wide geographical distribution and its capacity to accumulate xenobiotics, *M. edulis* is widely used as a sentinel organism to monitor the health of coastal ecosystems. In the present work, we have investigated the molecular pathways associated to phagocytosis and identified putative molecular biomarkers that could be used to monitor Cd toxicity of aquatic ecosystems. More specifically, we have: 1) identified 12 transcripts whose expression levels were modulated following Cd exposure, 2) validated their expression by RT-qPCR and 3) correlated their expression levels with phagocytosis and cell viability. The 12 transcripts included three transcripts associated with stress responses (*SOD*, *HSP70* and *CYP2C8*), three associated with DNA damage repair and apoptosis (*GADD45*, *XIAP* and *CAS8*), four immuno-related transcripts (*TLR2-like*, *TLR3*, *TLR4-like*, *RIG-I* and *NAS13*), and one calcium-dependent pathway (*CALM*). We found that higher expression levels of *HSP70*, *CYP*, *SOD*, *TLR*, *GADD45* and *XIAP* genes in hemocytes positively correlated with Cd exposure and inversely correlated with cell viability and phagocytosis. From a methodological perspective, we also found that both RT-qPCR and differential gene expression methods (DGE) technologies were significantly correlated and resulted in similar gene expression patterns. In summary, we identified a novel gene expression signature associated with impaired cellular functions of hemocytes following Cd exposure. Further investigations will be needed to validate the potential of this signature as a tool for assessing the status and health of aquatic marine ecosystems.

## KEYWORDS

Cadmium, mussel, molluscs, innate immune system, gene expression, RT-qPCR, apoptosis, hemocytes



## 2.1 Introduction

The blue mussel *M. edulis* is commonly used as a sentinel species to study the effect of heavy metals in marine environments. This bivalve is sedentary, relatively easy to maintain in laboratories, accessible, abundant, globally spread and it filters large quantity of contaminated water (Cuevas et al., 2015). Therefore, *M. edulis* has been used in several ecotoxicological studies and large scale biomonitoring programs, such as Mussel Watch (Kimbrough et al., 2008). The immune system of bivalves consists of both cellular and humoral components where hemocytes play a central role, mainly by performing phagocytosis, a multistep process involving multiple signaling pathways and proteins. Phagocytosis is triggered upon recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by intra and extra cellular receptors. The toll like-receptors (TLRs) and retinoic acid-inducible 1-like receptors (RLRs) are part of the pattern recognition receptors (PRRs) and their main function is to recognize PAMPs structures present in microorganisms (Costa et al., 2009). Their involvement in innate immunity against pathogens has been extensively documented to play dual roles in recognition of foreigner molecules and signaling transduction of innate immune responses (Song et al., 2016).

Cadmium (Cd) is a persistent environmental pollutant well known for its deleterious effects on the immune response of aquatic bivalves (Apeti et al., 2010; Evariste et al., 2017). As a bivalent cationic element, Cd penetrates cells through cellular membrane  $Ca^{2+}$  channels and binds to cytoplasmic and nuclear molecules (Thévenod, 2009). This alteration of intracellular levels of calcium ion can cause apoptosis (Wang et al., 2008). It has been documented that cadmium-induced carcinogenesis. Many other studies have revealed a strong association between XIAP expression levels and carcinogenesis. Elevated XIAP protein expression is described in a number of cancers (Golovine et al., 2010). Once inside the cells, Cd induces the formation of reactive oxygen species (ROS), antioxidant enzymes, or DNA damages. Several genes encoding proteins involved in oxidative stress (e.g. superoxide dismutase, catalase, glutathione-s-transferase) and resistance (e.g. cytochrome p450, metallothionein, multidrug resistance protein) as well as HSP70 have already been studied in hemocytes bivalves exposed to xenobiotics such as Cd (Mello et al., 2012; Rola et al., 2012; Ruiz et al., 2012). Another gene implicated in the signaling of physiological or environmental stress is GADD45. GADD45 provides information about cell cycle arrest, DNA repair, cell survival and senescence, or apoptosis.

It has been already shown induction of GADD45 related to genotoxic stress in presence of Cd in mussels (Arini et al., 2015; Varotto et al., 2013). However, effect of Cd exposure on the modulation of TLRs remains not very well understood.

Our previous study showed that *in vitro* exposure to  $10^{-3}$ M of Cd suppressed both hemocytes viability and phagocytosis (Granger Joly de Boissel et al., 2017). In the present work, we have validated the expression of specific molecular targets in Cd-exposed hemocytes and investigated their putative role in *M. edulis* immune response following exposure to Cd, focusing on expression of genes involved in immune system, apoptosis, DNA damage and calcium pathway systems, such as toll-like receptors (TLRs), retinoic acid-inducible 1-like receptors (RLRs); caspases (CASP8), X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), the growth arrest and DNA damage (GADD45) and calmodulin (Calm).

## 2.2 Materials and methodology

### 2.2.1 In vitro test, transcriptome assembly, annotation and differential gene expression (DGE)

The *in vitro* tests to expose cells to cadmium was done as it is described in (Granger Joly de Boissel et al., 2017). Concentration from  $10^{-3}$ M to  $10^{-9}$ M were used to exposed mussels' cells to cadmium and a control (non-exposed cells) was used. Based on the results obtained for the phagocytosis activity and cell viability, a *de novo* transcriptome was built based on sequences obtained from RNA extracted from non-exposed and  $10^{-3}$ M exposed-cells. For the procedure of the *de novo assembly*, see Granger Joly de Boissel et al., 2017. Once the transcriptome was obtained, a DGE analysis was carried out to compare gene expression between non-treated and  $10^{-3}$ M treated cells. A pre-functional annotation was done for the whole *de novo* transcriptome and expressed transcripts. In this study, the GO terms annotation for expressed genes was reviewed. The functional annotation of molecular pathways was performed using Ontology terms (GO) and KEGG pathways with Panther (Mi et al., 2016), UniProt (Apweiler et al., 2004) and KEGG (Kanehisa et al., 2017; Laboratories, 2014) web sites. GO terms, GO-slimmer terms and KO number were used to highlight changes in immunological pathways induced by Cd (Carbon et al., 2009) but only pointing genes involved in the immune system process (GO:0002376), cytoskeleton (GO:0005856), response to stress (GO:0006950), cell adhesion (GO:0007155), cell death (GO:0008219), oxidoreductase activity (GO:0016491) and cell motility (GO:0048870)

## 2.2.2 Real-time reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) analysis

Twelve targeted contigs and two housekeeping were selected based on their relevant roles in the innate immunity in mollusks. The housekeeping was selected based on their expression obtained during RNA-seq and DGE analysis. Primers were designed using default parameters in Primers3 and purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario) (**Table 1**). RT-qPCR optimisation and efficiency were evaluated for each set of primers based on the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE Guidelines) (Bustin et al., 2009). Total mRNA was extracted from freshly-collected hemocytes using the MiniKit Qiagen (Qiagen, Canada). To avoid any DNA contamination, genomic DNA was removed using the Turbo DNase kit. RNA was reverse transcribed into cDNA using High Capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo-Fisher) following the manufacturer's procedure. Mixture solution was prepared using 10X RT buffer, 25X dNTP, 10X RT random primers, MultiScribe Reverse Transcriptase, and UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water according to the manufacturer's recommendations. RNA was added to each well to get a 20 µL final volume. Retro-transcription was carried out at 25°C for 10 min, then 37°C for 120 min and finally 85°C for 5 min using a thermocycler (Bio-Rad MyCycler Thermal Cycler PCR). RT-qPCR specificity was carried out with a LightCycler® 480 (Roche, Canada). To ensure primer specificity, melting temperature curves were determined for each amplicon. RT-qPCR products were run on a 0.5% agarose gel to visualize the bands and ensure a unique band is amplified. qPCR reaction (QuantiFast SYBR Green PCR Kit, Qiagen) was performed mixing 12.5 µL of 2X SYBRGreen PCR Mix (1X Mg<sup>2+</sup>), 2.50 µL of primers (1µM) and 5.5 µL of UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water. Finally, 2 µL of cDNA was added to each reaction mixture. qPCR cycling steps were 5 min at 95°C followed by 40 cycles at 95°C for 10s and 60°C for 30s with a single acquisition. A final melting curve analysis was performed using 95°C during 5s, 65°C during 60 s and 97°C with a continuous acquisition. Standard curve analysis was performed for each set of primers to evaluate the efficiency. The slope of each standard curve was used to calculate the percentage of qPCR efficiency (**Supplementary data – S1**). A five time 10-fold serial dilution was prepared by diluting cDNA pool sample into UltraPure™ DNase/RNase-Free distilled water. Four replicates per dilution were performed for each set of primers. Cycling qPCR steps were 5 min at 95°C followed by 40 cycles at 95°C for 10s and 60°C for 30s with a single acquisition followed by a melting curve analysis post run to check for PCR product specificity. Except for TLR-F and RIG-I, the annealing temperature was 62°C instead of 60°C.



### 2.2.3 Differential Gene Expression (DGE) analysis and rt-qPCR.

Gene expression levels evaluated by RNA-seq (LogFC\$DGE) were validated using RT-qPCR. Gene expression levels as measured by RT-qPCR were expressed as log base 2 of Fold Change (FC) (Livak and Schmittgen, 2001). According to Livak and Schmittgen (2001), the delta CT ( $\Delta$ CT) value was calculated by subtracting the averaged threshold cycle (CT) value of the two housekeeping genes (EF1G and SNX14) from the CT value of the target gene (Livak and Schmittgen, 2001, **Supplementary data - S1**).

### 2.2.4 Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using the RStudio 3.2.3 software (Team, 2015). DGE enrichment was performed using Bioconductor – edgeR package based on exactTest. Gene Ontology (GO) terms were assigned by GO Amigo (Carbon et al., 2009). Pearson's correlation was used to correlate differential gene expression obtained by both DGE and RT-qPCR. For gene expression obtained by RT-qPCR, the normality of data distribution was checked on residues using the Shapiro-Wilk test. Variance homogeneity was evaluated using the Bartlett test. In case of homogenous variance and normalized data, ANOVA analysis was performed, followed by the Tukey post-hoc test. Otherwise, data were analysed using the Kruskal-Wallis as a non-parametric test. Principal component analysis followed by Pearson's correlation were performed using viability, phagocytosis (P1 and P3) and differential gene expression (only RT-qPCR gene expression value statistically different were used). For all statistical test a  $p$ -value < 0,05 was used.

**Tableau 1: List of primers, annealing temperatures (°C) and RTqPCR efficiency (%)**

<b>Gene</b>	<b>Name</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Annealing temperature</b>	<b>qPCR efficiency (%)</b>
<i>EF1G</i>	Elongation factor 1 - gamma	aaagctcaaattgcagcgga	atgcaatctcctccagctgt	60,00	105
<i>SNX14</i>	Sorting nexin-14	agagggcgaggatcagatgtg	atcttcaccaccaccagagg	60,00	110
<i>HSP70</i>	Heat shock protein 70	acagagagactgttggcga	ttccgatcagtctcttgga	60,00	99
<i>CYP2C8</i>	Cytochrome P450 Family 2 subfamily C	gcgagttgggttggaag	cgcaaaagtcaaaagtctc	60,00	108
<i>GST</i>	Glutathione s-transferase pi (3)	ttgctgtagaggaagaggc	gcctgccagtctctcatctt	60,00	96
<i>SOD<sub>Cu/Zn</sub></i>	Superoxide dismutase	accatgtgctctacaggat	ttgatcaggttccgatggc	60,00	99
<i>CALM</i>	Calmodulin	gcaacggttatgtcagtg	tcatccacctctctgtctg	60,00	107
<i>Casp8</i>	Caspase 8	tacgtaggacatcgcttg	gtgctctggtggtgctttc	60,00	110
<i>XIAP</i>	X-linked inhibitor of apoptosis protein	tcccgaacaacgtaaagg	gacaaacacctatgctcagt	60,00	104
<i>GADD45</i>	growth arrest and DNA damage	cctcgtgattcctgggtgc	cgtcatacaacagcagacg	60,00	103
<i>NAS13</i>	Astacin 13-like	atgttttgccatggtgctc	gcccgtatcaagtcaggcat	60,00	102
<i>TLR3</i>	Toll like receptor 3	gaaaggcacgacttcctcac	gagctcgaccaagttcat	60,00	109
<i>TLR2-like</i>	Toll like receptor 2	caacatggcaagaatggaaagt	attgccatgctcatcgttgg	60,00	109
<i>TLR4-like</i>	Toll like receptor 4	atcccaggctgctctttgg	catgtgccggaactttgagg	62,00	93
<i>RIG-1</i>	Retinoic acid-inducible gene 1-like	gcgaaacaaagtgcacgat	tgctactagacggaagctgt	62,00	93



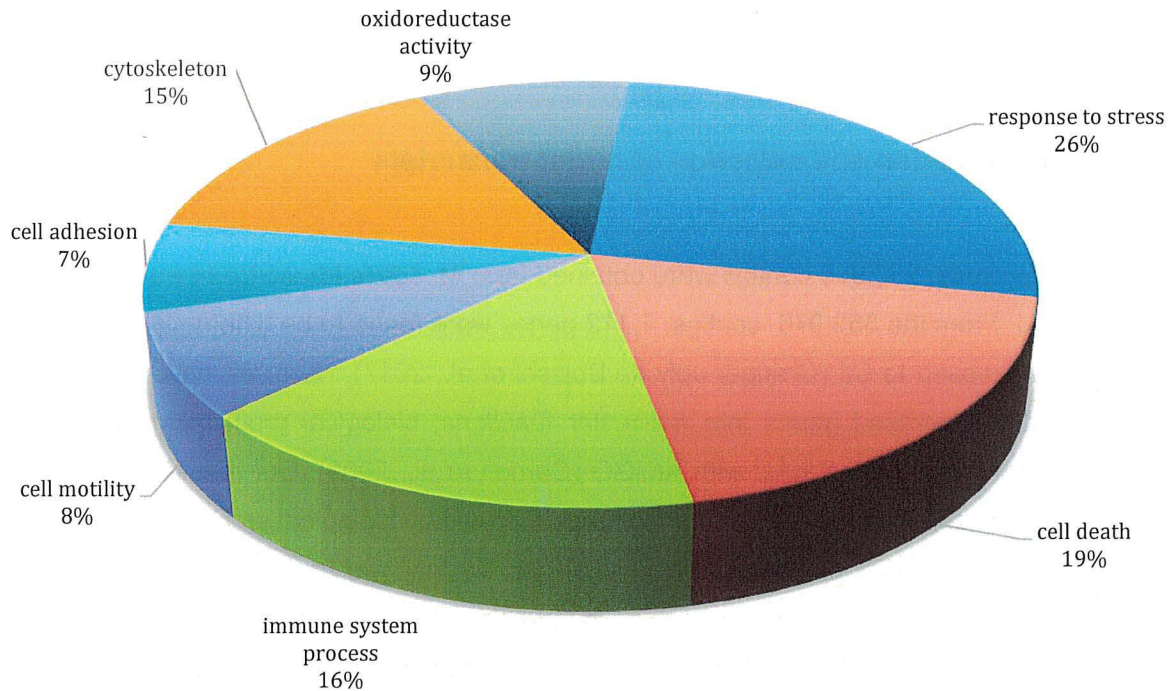
## 2.3 Results

### 2.3.1 DGE annotation and selection of target transcripts

In our previous study, 352,976 contigs were obtained from *M. edulis* transcriptome of hemocytes exposed to Cd. From the 352,976 contigs, 1,112 genes were found to be differentially regulated in hemocytes exposed to Cd (Granger Joly de Boissel et al., 2017). Here, we have categorized the differentially expressed genes into molecular functions, biological processes and cellular components using *in silico* analysis with AmiGO (Carbon et al., 2009). Our results showed that 45.4% of total hits consisted of cellular components, followed by biological processes with 40.7% and finally molecular functions with 13.8% of total hits. To facilitate transcripts analysis among these three groups, expressed genes were clustered into 149 different GO-slimmer terms. Slimmer terms with more than 100 hits are involved in immune system process (GO:0002376), response to stress (GO:0006950), cell adhesion (GO:0007155), cell death (GO:0008219), oxidoreductase activity (GO:0016491), cytoskeleton (GO:0005856) and cell motility (GO:0048870).

A total of 184 out of 1,112 transcripts were part of at least one of the slimmer terms listed above and the percentage of hits was recorded for each category (**Fig. 1**). Response to stress was the most represented category with 26% of total hits, followed by cell death (19%), immune system process (16%) and finally cytoskeleton (15%). The most abundant transcripts were *HSP70* (15 contigs), followed by *XIAP* (10 contigs), *BIRC3* and *BIRC7* with 5 and 3 contigs respectively. Finally, sequences related to *SOD*, *GST*, and *TLRs* were each represented by 3 contigs. Based on this analysis, 12 possible annotated contigs were selected including *HSP70*, *XIAP*, *SODCu/Zn* (*SOD*), 3 *TLRs* (*TLR3*, *TLR2-like* and *TLR4-like*), *RIG-I*, *CASP8*, *CYP2C8*, *GADD45α*, *CALM* and Astacin-like (*NAS13*) for further analysis by RT-qPCR.





**Figure 1: Gene Ontology (GO-Slimmer) hit percentage**

### 2.3.2 RT-qPCR analysis and comparison with DGE analysis

Gene expression quantification of selected transcripts was validated by RT-qPCR using conditions that were optimized to achieve efficiency between 90 and 110% for all sets of primers (**Table 1**). Expression levels of housekeeping genes were compared between exposed and non-exposed conditions. No significant differences were found between both conditions (**Supplementary data – S2**). These housekeeping genes were thus used to study the relative expression of the selected genes. Our analysis showed that *HSP70* (FC = 153.6) and *CYP2C8* (FC = 22.2) were the highest upregulated genes by Cd (**Fig., 2A**). Expression of immuno-related genes *TLR 3* (FC = 55.8), *TLR2-like* (FC = 22.6), *RIG-1* (FC=4.2) and *Caln* (FC =14.1) were significantly upregulated whereas *TLR4-like* (FC = 0,19) and *NAS13* (FC = 0,011) were down-regulated by Cd. Expressions of *XIAP* (FC=38), *GADD45* (FC=10) and *Cas8* (FC=2) genes involved in apoptosis and DNA damage regulation were also up-regulated by Cd. Although the regulation of all the selected genes was significant by DGE, expressions of *CAS8*, *TLR4-like* and *RIG-1* were not statistically different by RT-qPCR (**Fig. 3A**).

RT-qPCR data were then compared to DGE data analysed by RNAseq experiment (Granger Joly de Boissel et al., 2017). Overall, both technologies provided similar differential gene expression patterns (**Fig. 2A and 2B**, regression  $p < 0.001$ ; Pearson's correlation coefficient  $R^2 = 0.8857$ ). For example, both technologies showed that *NAS13* and *TLR4-like* were down-regulated whereas all remaining transcripts were up-regulated. In both cases, *CASP8*, *GA45G* and *RIG1* were the lowest up-regulated genes whereas *SOD* and *HSP70* were the highest up-regulated by RNAseq method. Some differences, however, were found between both procedures. For example, *SOD* was the highest up-regulated gene by RNA-seq whereas the highest up-regulated gene was represented by *HSP70* using RT-qPCR. It is noteworthy that for all the selected contigs, the  $\log_2FC$  was higher by RNA-seq than by RT-qPCR except for *NAS13*. Also, a higher data variability was observed with RT-qPCR than RNAseq technology for certain genes, including *CASP8*, *CYP2C8*, *TLR3*, *XIAP*, and *HSP70*.

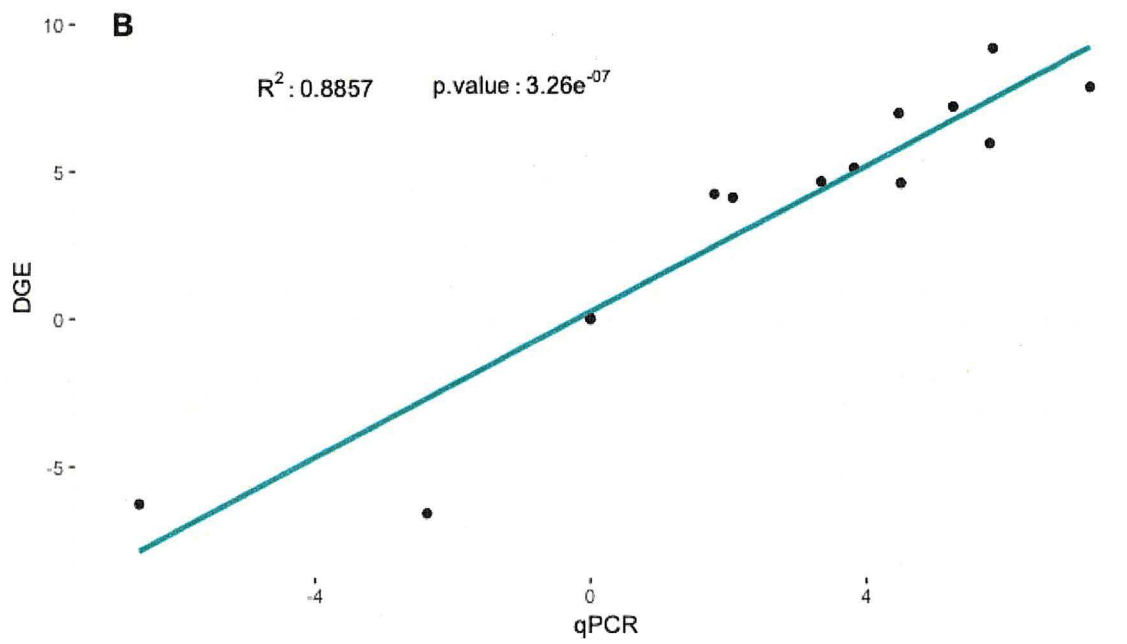
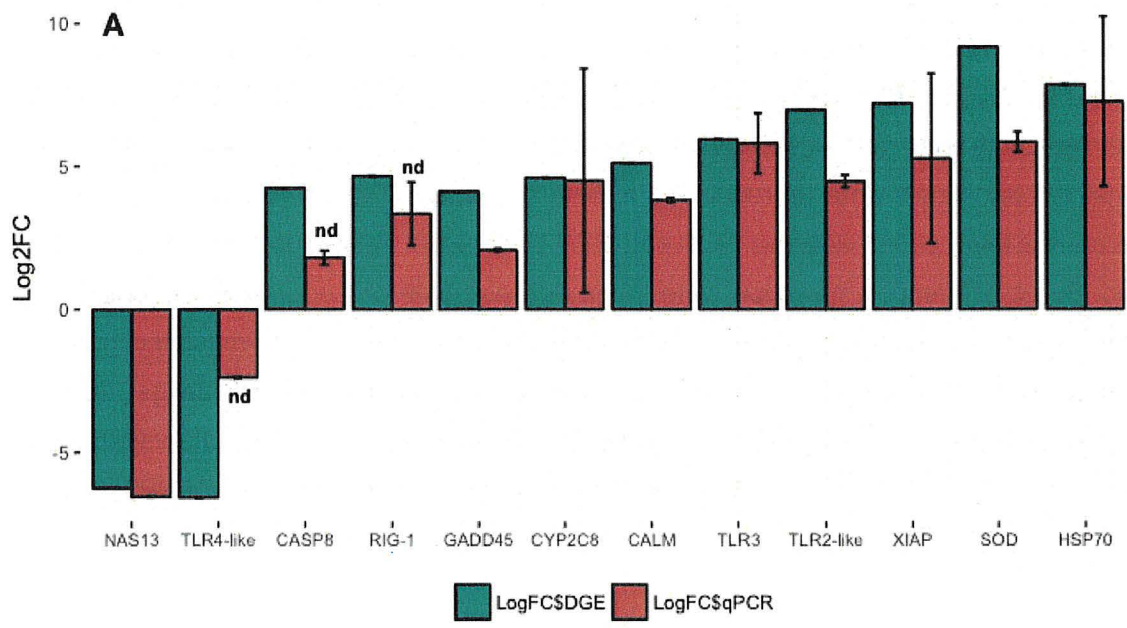


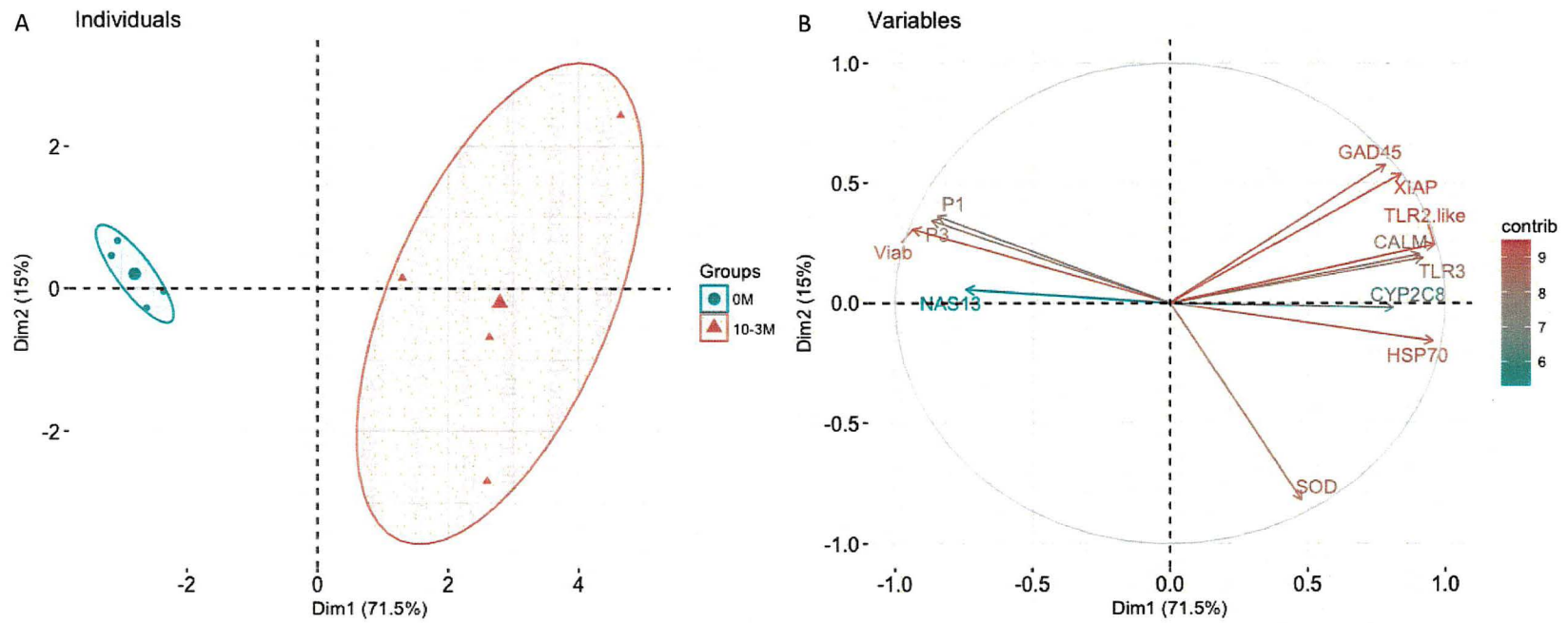
Figure 2: A) Gene expression levels (Log<sub>2</sub>FC) obtained by DGE and RT-qPCR (Means ± SD for RT-qPCR results. p-value<0,05, nd= no statistical differences); B) Pearson's correlation (p-value<0,05) of gene expression obtained by DGE (DGE) and RT-qPCR (qPCR).



### 2.3.3 Principal component analysis (PCA)

Principal component analysis (PCA) was next used to investigate possible relationships between expression levels, hemocytes function variables and treatment conditions (Yang et al., 2011). Our data revealed that two main principal components explaining 86,5% of our total data variations, from which 71,5% of variations are explained by dimension 1 (Dim 1) and 15% of variations explained by dimension 2 (Dim 2) (**Fig. 3**). An individual map showed that two independent clusters were represented by samples exposed to Cd and controls (**Fig. 3A**). Control samples were grouped within Dim 1 whereas Cd-exposed samples had a more dispersed distribution. The variable map represents variables and their contribution to the PCA in percentage (**Fig. 3B**). The PCA analysis showed that the viability and phagocytosis were inversely correlated with gene expression data. *NAS13* and *CYP2C8* expressed genes contributed minimally to the PCA than the other transcripts (**Supplementary data – S3**). *NAS13* was correlated with cell viability and phagocytosis whereas *CYP2C8* was inversely correlated with both viability and phagocytosis. *HSP70* transcript was inversely correlated with hemocyte functions as well as other transcripts associated with immune functions (*TLR* and *Calm*) and cell cycle (*XIAP*, *GADD45*). It is noteworthy that both immune-related transcripts *TLR* and *Calm* as well as transcripts associated with cell cycle were grouped in independent clusters.

Correlations between different variables obtained by PCA analysis were performed using Pearson's test (**Fig. 4**). Four clusters were differentiated on the variable map (**Fig. 3B**). Cluster 1 included cell functions (phagocytosis P1/P3 and viability) and *NAS13*, cluster 2 included *XIAP* and *GADD45* which are both involved in apoptosis and DNA damage ( $R^2=0,95$ ), cluster 3 was included TLRs and Calmodulin, which play a key role in hemocyte immune system ( $R^2 =$  from 0.88 to 0.94) while cluster 4 was represented by *HSP70* and *CYP2C8*, which are key regulators of stress functions ( $R^2 = 0.91$ ). Cluster 1 was inversely correlated with Clusters 3 and 4 ( $R^2$  ranging from - 0.71 to - 0.94). Clusters 2, 3 and 4 were positively correlated ( $R^2 = 0.7-0.9$ ) while no correlations were found between Clusters 1 and 2. Finally, *SOD* had no cluster and a negative correlation was recorded with viability ( $R^2 = - 0.72$ ).



**Figure 3; A. Individuals and B. Variables map of the principal component analysis (PCA) using gene expression obtained by RTqPCR (RIG-I, CASP8 and TLR4-like were not used) and cell parameters (Viab=viability; P1 = one and more beads engulfed and P3= three and more beads engulfed). Vectors in red: strong contribution to the PCA and vectors in blue: low contribution to the PCA. More information about PCA contribution can be found in Supplementary data – S3**

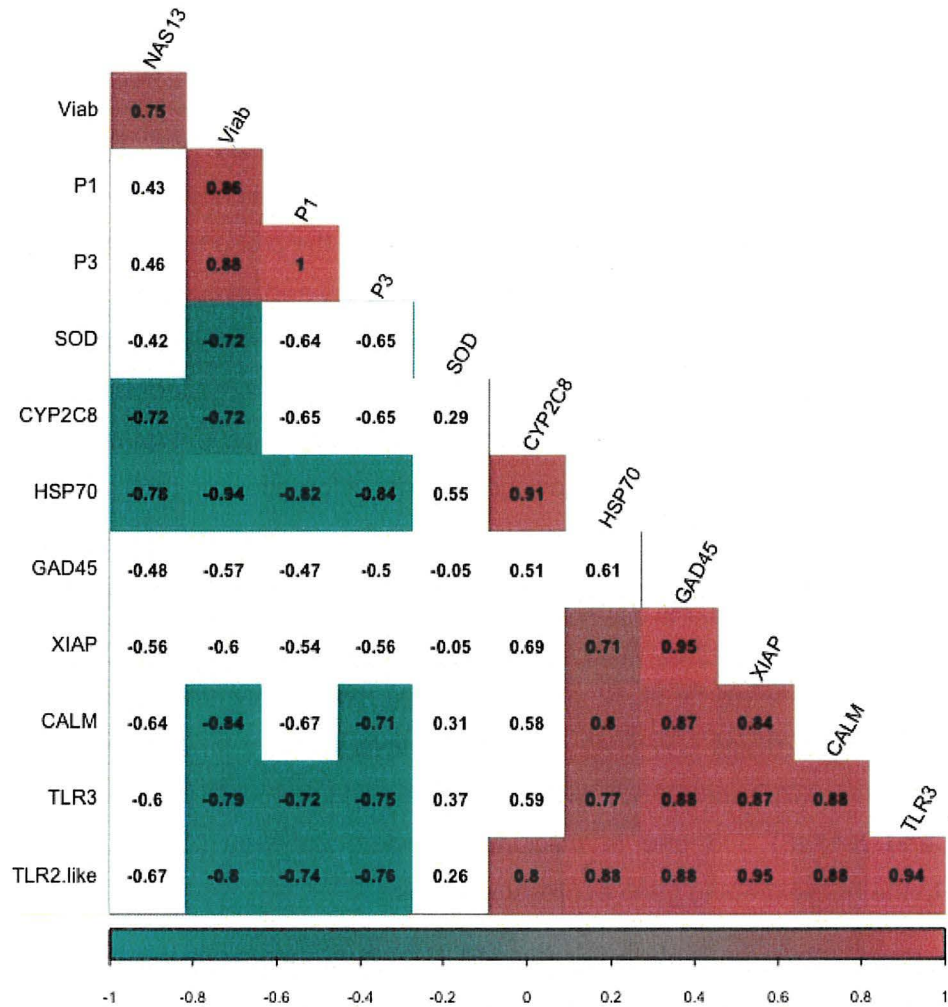


Figure 4: Pearson's correlations of gene expression obtained by qPCR (RIG-I, CASP8 and TLR4-like were not used) and cell parameters (Viab=viability; P1 = one and more beads engulfed and P3= three and more beads engulfed). Values of  $R^2$  obtained are shown inside of the squares, blue square represent anti-correlation (p-value < 0,05), red squares represent positive correlation (p-value<0,05) and white square represent the value of  $R^2$  statistically not different.



## 2.4 Discussion

Our previous study showed that Cd induced inhibition of phagocytosis. This inhibition was associated with a differential expression of genes involved in phagocytosis, detoxification and metabolic pathways (Granger Joly de Boissel et al., 2017). In the present work, we have validated the expression of specific molecular targets in Cd-treated cells and investigated their putative role in *M. edulis* immune response, focusing on expression of genes involved in immune response, apoptosis, DNA damage and metabolism of calcium. This was accomplished using both RT-qPCR and DGE methods. Overall, both approaches resulted in similar gene expression patterns, as shown by a strong linear correlation. However, some differences of both approaches were highlighted.

The difference of  $\log_2FC$  between RT-qPCR and DGE is possibly due to the intrinsic variations associated with both technologies. After optimizing the conditions, RT-qPCR was performed to quantify the expression levels for all 12 genes, including three transcripts associated with stress responses (*SOD*, *HSP70* and *CYP2C8*), three transcripts involved in DNA damage repair and apoptosis (*GADD45*, *XIAP* and *CAS8*), five immune-related transcripts (*TLR2-like*, *TLR3*, *TLR4-like*, *RIG-I* and *NAS13*) and one in calcium-dependent pathway (*CALM*). The data were normalized to the housekeeping gene expression levels.

Cd exposure is well known for its ability to induce ROS such as superoxide ion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals (Bagchi et al., 1997; Liu et al., 2009; Manca et al., 1994). In our study, *HSP70*, *SOD* and *CYP2C8* were over-expressed by 153-, 57- and 22-fold as compared to controls. The main enzyme implicated in detoxification of ROS is *SODCu/Zn* (Regoli and Giuliani, 2014). *SOD* genes in invertebrates are well known to be induced by various stressors like heavy metal exposure, microorganisms and organic pollutants (De Zoysa et al., 2009; Ni et al., 2007). Previous studies have shown that *SOD* acts as an antioxidant defense factor to protect bivalves against Cd or Hg toxicity (Fang et al., 2013, 2010). *SOD* gene expression has been induced in *Mytilus galloprovincialis* (Regoli and Principato, 1995) and *Crassostrea angulata* (Funes et al., 2006; Macías-Mayorga et al., 2015) and approximately by 5-fold in *Ostrea vulgaris* para-larvae exposed to 100 µg/L of Cd (Nicosia et al., 2015).

Another commonly used stress-response molecular biomarker in bivalves (Clayton et al., 2000; Gao et al., 2007) is *HSP70*, another gene which expression is well known to be induced upon exposure to metals (Choi et al., 2008; Ivanina et al., 2008).

Several studies have confirmed a rapid expression of *HSP70* genes in aquatic organisms as a result of osmotic (Smith et al., 1999), thermal (Piano et al., 2004, 2002), and stress exposure (Franzellitti and Fabbri, 2005; Piano et al., 2004). Here, we found that *HSP70* was overexpressed by 153-fold. Similar observations were made in larvae of zebra mussel *Dreissena polymorpha* and in *M. galloprovincialis* gills exposed to Cd (Navarro et al., 2011; You et al., 2013). Our data thus support the relevance of using *HSP70* gene as a biomarker for measuring Cd-induced stress in hemocytes of *M. edulis*.

In the present study, we found that *CYP2C8* gene expression was induced by 22-fold in *M. edulis* hemocytes following exposure to  $10^{-3}$ M Cd. *CYP2C8* is a member of the CYP450 protein family. It plays a key role in biotransformation of xenobiotics (Zanette et al., 2013, 2010). For instance, it has been shown that ROS induced by Cd would interact with AhR ligand, leading to an induction of AhR which in turn controls most of the mechanisms involved in CYP induction (Elbekai and El-Kadi, 2004). Furthermore, the induction of AhR-dependant genes by ROS suggests that the co-exposition ROS/Cd may regulate the stability of enzymes involved in the xenobiotics biotransformation processes. These regulations could lead to a dysregulation of cell protection system as well as the antioxidant system mechanisms (Elbekai and El-Kadi, 2004). However, the lack of information about *CYP2C8* roles and functions in mussels' hemocytes does not allow any further interpretation.

Our data showing that *GADD45* gene expression in hemocytes was induced by more than 10-fold following treatment with Cd is consistent observations in the zebra fish model (Chen et al., 2014) and in human cells where *GADD45* is known to be induced following exposure to carcinogenic compounds that induce DNA damage (Scott et al., 2005). *GADD45* also plays a role in cell differentiation, cell homeostasis, and stress response, as well as in growth control, cell cycle arrest, and cell proliferation (Chen et al., 2014; Liebermann and Hoffman, 2002). This suggests that Cd may alter vital cell functions, such as cell division, through DNA damage, and lead to apoptosis of hemocytes. In addition to *GADD45* induction, we also found that *XIAP* was overexpressed (by more 38-fold) in hemocytes of *M. edulis*. *XIAP* is part of the IAP family and it is a protein with three zinc-binding baculovirus IAP repeat (BIR) domains. These domains are essential for the inhibitory activity of XIAP in apoptosis (Mufti et al., 2006). Interestingly, induction of *XIAP* in bivalves has not been reported yet. *XIAP* is the only member of the IAP family that can directly inhibit the initiation phase as well as the execution phase of the caspase cascade. Whether induction of caspase and *GADD45* is related to apoptosis and *XIAP* is induced to counteract apoptosis is an interesting possibility (Bauler, 2009).



Taken together, these results suggest that *GADD45* and *XIAP* would be useful molecular makers to detect an altered balance of apoptotic signals in hemocytes exposed to Cd.

TLRs are found throughout the animal kingdom and their signalling pathway is highly conserved. Here, a particular attention was paid to *TLR2-like*, *TRL3* and *TLR4-like*, which have been identified in many species, including *M. edulis*, *Cristaria plicata*, *Branchiostoma floridae*, *Xenopus laevis* and *Caenorhabditis elegans* (Patnaik et al., 2016; Philipp et al., 2012). Our results showed that *TLR2-like* and *TLR3* were both up-regulated in Cd-treated hemocytes by more than 20- and 50-fold respectively as compared to controls. In contrast, no significant changes were observed for *TLR 4* and *RIG-I*. To our knowledge, the regulation of TLRs genes by Cd has never been investigated in bivalves. Previous studies in human and mouse cells have shown that metals and metallic nanoparticles can regulate TLRs gene expression. For instance, Schmidt *et al.* (2010) reported that  $Ni^{2+}$  was acting directly through TLR to trigger inflammation responses. Several types of nanoparticles (e.g.,  $TiO_2$ , ZnO,  $ZrO_2$ , and Ag) can also modulate immune responses via TLRs (Schmidt et al., 2010).  $TiO_2$  and  $ZrO_2$  nanoparticles have been shown to increase *TLR3*, *TLR7* and *TLR10* in human U-937 macrophages and that of *TLR2* and *TLR4* in mouse liver cells (Cui et al., 2011; Lucarelli et al., 2004). In control human bronchial epithelial cells (BEAS-2B), three TLRs (*TLR3*, 4, 6) have been reported to be induced following exposure to Cd (Cartularo et al., 2016) while in NCI-H292 airway epithelial cells and primary cultures of normal nasal epithelial cells, Cd can lead to induction of *TLR4* but not *TLR2* (Song et al., 2016). These data open new avenues to investigate further the effect of Cd on *TLR* in hemocytes of *M. edulis*.

Calmodulin is well known for its ability to regulate cellular calcium metabolism (Friedberg and Rhoads, 2001; Ikura and Ames, 2006; Li et al., 2004).. In this study, *Calm* was over-expressed more than 14 times in Cd-treated hemocytes. These results are reminiscent of those observed in hemocytes of *S. glomerata* treated with Zn (Taylor et al., 2015). These results suggest that *Calm* expression in hemocyte is sensitive to metals and may play a crucial role in protecting the cells against metal contamination (Bao and Lin, 2010). Changes in the expression of *Calm* genes following metal exposure may lead to a disruption of the cytoskeletal cell architecture and possibly affect major cellular functions, including phagolysosomal activity in mollusks (Choong et al., 2014; Renault et al., 2011; Wang et al., 2010). *Calm* has also been linked to apoptosis, as suggested by Olofsson *et al* (2008) who showed that several apoptosis-inducing agents required  $Ca^{2+}$ , CaM and CaMK-II to initiate apoptotic signaling (Choong et al., 2014; Olofsson et al., 2008).



In summary, our study showed that Cd induces a differential expression of genes that play a key role in the immune system of *M. edulis* hemocytes. Overall, Cd induced expression of *HSP70*, *CYP*, *SOD*, *TLR*, *GADD45* and *XIAP* genes.

Expression levels of these genes were inversely correlated with viability and phagocytosis. Interestingly, the induction of *GADD45* gene expression could be related to some level of DNA damages and possibly induction of apoptosis, as suggested in previous studies by induction of TLRs, *MYD88*, *CALM* and *CAS8* genes following Cd exposure (Aliprantis et al., 2000; Iorns et al., 2009; Salaun et al., 2007). Indeed, *TLR2* and *TLR4* induction could lead to *MYD88* activation and recruitment of FADD (found in *M. edulis* transcriptome) receptor which can promote caspase 8, leading to apoptosis (*MYD88* and *CAS8* were overexpressed in *M. edulis* transcriptome – **Supplementary data – S4**). Further studies are needed to investigate in details the molecular pathways leading to apoptosis following exposure to Cd.

#### ACKNOWLEDGMENT:

This study was funded by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada ([NSERC STPGP 430539-2012](#)) Strategic Grant.

## 2.5 References

- Aliprantis, A.O., Yang, R., Weiss, D.S., Godowski, P., Zychlinsky, A., 2000. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J.* 19, 3325–3336.
- Apeti, D.A.A., Lauenstein, G.G.G., Christensen, J.D.D., Kimbrough, K., Johnson, W.E.E., Kennedy, M., Grant, K.G.G., 2010. A historical assessment of coastal contamination in Birch Harbor, Maine based on the analysis of mussels collected in the 1940s and the Mussel Watch Program. *Mar Pollut Bull* 60, 732–742. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.11.021
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., Barker, W.C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., 2004. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 32, D119.
- Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D., Duchemin, M., 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 393–405. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.ecoenv.2005.10.016
- Bagchi, D., Vuchetich, P.J., Bagchi, M., Hassoun, E.A., Tran, M.X., Tang, L., Stohs, S.J., 1997. Induction of Oxidative Stress by Chronic Administration of Sodium Dichromate [Chromium VI] and Cadmium Chloride [Cadmium II] to Rats. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 471–478. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/S0891-5849(96)00352-8
- Bao, Y., Lin, Z., 2010. Generation, annotation, and analysis of ESTs from hemocyte of the bloody clam, *Tegillarca granosa*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 740–746. doi:10.1016/j.fsi.2010.07.009
- Bauler, L.D., 2009. XIAP promotes the innate immune response during cytosolic bacterial infection. ProQuest.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Brousseau, P. (Pauline), 1999. Manual of immunological methods. CRC Press.
- 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. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/S0300-483X(99)00165-1

- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797 [doi]
- Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C.J., Shu, S., Marshall, B., Lewis, S., Group, W.P.W., 2009. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* 25, 288–289.
- Cartularo, L., Kluz, T., Cohen, L., Shen, S.S., Costa, M., 2016. Molecular Mechanisms of Malignant Transformation by Low Dose Cadmium in Normal Human Bronchial Epithelial Cells. *PLoS One* 11, e0155002.
- Chao, S.H., Suzuki, Y., Zysk, J.R., Cheung, W.Y., 1984. Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius. *Mol. Pharmacol.* 26, 75–82.
- Chen, Y.Y., Zhu, J.Y., Chan, K.M., 2014. Effects of cadmium on cell proliferation, apoptosis, and proto-oncogene expression in zebrafish liver cells. *Aquat. Toxicol.* 157, 196–206. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.aquatox.2014.10.018
- Choi, Y.K., Jo, P.G., Choi, C.Y., 2008. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 147, 286–292. doi://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.11.002
- Choong, G., Liu, Y., Templeton, D.M., 2014. Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 211, 54–65. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.cbi.2014.01.007
- Clayton, M.E., Steinmann, R., Fent, K., 2000. Different expression patterns of heat shock proteins hsp 60 and hsp 70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper and tributyltin. *Aquat. Toxicol.* 47, 213–226.
- Costa, M.M.M., Prado-Alvarez, M., Gestal, C., Li, H., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A., 2009. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish Shellfish Immunol* 26, 515–523. doi:10.1016/j.fsi.2009.02.001
- Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P.M., Franco, J., Larreta, J., 2015. Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: Integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquat. Toxicol.* 162, 152–164. doi://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.011



- Cui, Y., Liu, H., Zhou, M., Duan, Y., Li, N., Gong, X., Hu, R., Hong, M., Hong, F., 2011. Signaling pathway of inflammatory responses in the mouse liver caused by TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 96, 221–229.
- De Zoysa, M., Jung, S., Lee, J., 2009. First molluscan TNF- $\alpha$  homologue of the TNF superfamily in disk abalone: Molecular characterization and expression analysis. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 625–631. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.fsi.2008.10.004
- Elbekai, R.H., El-Kadi, A.O.S., 2004. Modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated gene expression by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicology* 202, 249–269. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.tox.2004.05.009
- Evariste, L., Rioult, D., Brousseau, P., Geffard, A., David, E., Auffret, M., Fournier, M., Betoulle, S., 2017. Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 137, 78–85. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.11.027
- Fang, Y., Yang, H., Liu, B., Zhang, L., 2013. Transcriptional response of lysozyme, metallothionein, and superoxide dismutase to combined exposure to heavy metals and bacteria in *Macraa veneriformis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 157, 54–62. doi:10.1016/j.cbpc.2012.10.002
- Fang, Y., Yang, H., Wang, T., Liu, B., Zhao, H., Chen, M., 2010. Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam *Macraa veneriformis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 151, 325–333. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.cbpc.2009.12.005
- Franchi, N., Ballarin, L., 2013. Influence of cadmium on the morphology and functionality of haemocytes in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 158, 29–35. doi:10.1016/j.cbpc.2013.04.003
- Franzellitti, S., Fabbri, E., 2005. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 1157–1163. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.bbrc.2005.08.244
- Friedberg, F., Rhoads, A.R., 2001. Evolutionary Aspects of Calmodulin. *IUBMB Life* 51, 215–221. doi:10.1080/152165401753311753

- Funes, V., Alhama, J., Navas, J.I., López-Barea, J., Peinado, J., 2006. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environ. Pollut.* 139, 214–223. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.envpol.2005.05.016
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2004. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 501–512. doi:10.1016/j.fsi.2003.08.007
- Gao, Q., Song, L., Ni, D., Wu, L., Zhang, H., Chang, Y., 2007. cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 147, 704–715.
- Golovine, K., Makhov, P., Uzzo, R.G., Kutikov, A., Kaplan, D.J., Fox, E., Kolenko, V.M., 2010. Cadmium down-regulates expression of XIAP at the post-transcriptional level in prostate cancer cells through an NF-kappaB-independent, proteasome-mediated mechanism. *Mol. Cancer* 9, 183. doi:10.1186/1476-4598-9-183
- Granger Joly de Boissel, P., 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 Immunol.* 67, 575–585. doi:10.1016/j.fsi.2017.06.001
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Friedman, N., Regev, A., 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nat. Protoc.* 8, 10.1038/nprot.2013.084. doi:10.1038/nprot.2013.084
- Ikura, M., Ames, J.B., 2006. Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 1159–1164.
- Iorns, E., Lord, C.J., Grigoriadis, A., McDonald, S., Fenwick, K., MacKay, A., Mein, C.A., Natrajan, R., Savage, K., Tamber, N., 2009. Integrated functional, gene expression and genomic analysis for the identification of cancer targets. *PLoS One* 4, e5120.
- Ivanina, A. V, Cherkasov, A.S., Sokolova, I.M., 2008. Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *J. Exp. Biol.* 211, 577–586.

- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., Morishima, K., 2017. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 45, D361.
- Kimbrough, K.L., Johnson, W.E., Lauenstein, G.G., Christensen, J.D., Apeti, D.A., 2008. An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation's Coastal Zone. <br>. Silver Spring, MD. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 74.
- Laboratories, K., 2014. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [WWW Document]. URL <http://www.genome.jp/kegg/>
- Li, B., Dewey, C.N., 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 323. doi:10.1186/1471-2105-12-323 [doi]
- Li, S., Xie, L., Zhang, C., Zhang, Y., Gu, M., Zhang, R., 2004. Cloning and expression of a pivotal calcium metabolism regulator: calmodulin involved in shell formation from pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 138, 235–243. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.cbpc.2004.03.012
- Liebermann, D.A., Hoffman, B., 2002. Myeloid differentiation (MyD)/growth arrest DNA damage (GADD) genes in tumor suppression, immunity and inflammation. *Leukemia* 16, 527–541. doi:10.1038/sj.leu.2402477 [doi]
- Liu, J., Qu, W., Kadiiska, M.B., 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 209–214.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lucarelli, M., Gatti, A.M., Savarino, G., Quattroni, P., Martinelli, L., Monari, E., Boraschi, D., 2004. Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles. *Eur. Cytokine Netw.* 15, 339–346.
- Macías-Mayorga, D., Laiz, I., Moreno-Garrido, I., Blasco, J., 2015. Is oxidative stress related to cadmium accumulation in the Mollusc *Crassostrea angulata*? *Aquat. Toxicol.* 161, 231–241. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.aquatox.2015.02.007
- Manca, D., Ricard, A.C., Van Tra, H., Chevalier, G., 1994. Relation between lipid peroxidation and inflammation in the pulmonary toxicity of cadmium. *Arch. Toxicol.* 68, 364–369.



- Mello, D.F., de Oliveira S., E., Vieira, R.C., Simoes, E., Trevisan, R., Dafre, A.L., Barracco, M.A., 2012. Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed in vitro to brevetoxin (PbTx-2). *Mar. Drugs* 10, 583–597. doi:10.3390/md10030583
- Mi, H., Huang, X., Muruganujan, A., Tang, H., Mills, C., Kang, D., Thomas, P.D., 2016. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* gkw1138.
- Mufti, A.R., Burstein, E., Csomos, R.A., Graf, P.C.F., Wilkinson, J.C., Dick, R.D., Challa, M., Son, J.-K., Bratton, S.B., Su, G.L., Brewer, G.J., Jakob, U., Duckett, C.S., 2006. XIAP Is a Copper Binding Protein Deregulated in Wilson's Disease and Other Copper Toxicosis Disorders. *Mol. Cell* 21, 775–785. doi://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.033
- Navarro, A., Faria, M., Barata, C., Pia, B., 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ. Pollut.* 159, 100–107.
- Ni, D., Song, L., Gao, Q., Wu, L., Yu, Y., Zhao, J., Qiu, L., Zhang, H., Shi, F., 2007. The cDNA cloning and mRNA expression of cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase (SOD) gene in scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 1032–1042. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.fsi.2007.04.008
- Nicosia, A., Salamone, M., Mazzola, S., Cuttitta, A., 2015. Transcriptional and biochemical effects of cadmium and manganese on the defense system of *Octopus vulgaris* paralarvae. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–11. doi:10.1155/2015/437328
- Olofsson, M.H., Havelka, A.M., Brnjic, S., Shoshan, M.C., Linder, S., 2008. Charting calcium-regulated apoptosis pathways using chemical biology: role of calmodulin kinase II. *BMC Chem. Biol.* 8, 2.
- Patnaik, B.B., Wang, T.H., Kang, S.W., Hwang, H.-J., Park, S.Y., Park, E.B., Chung, J.M., Song, D.K., Kim, C., Kim, S., 2016. Sequencing, de novo assembly, and annotation of the transcriptome of the endangered freshwater pearl bivalve, *Cristaria plicata*, provides novel insights into functional genes and marker discovery. *PLoS One* 11, e0148622.
- Philipp, E.E.R., Kraemer, L., Melzner, F., Poustka, A.J., Thieme, S., Findeisen, U., Schreiber, S., Rosenstiel, P., 2012. Massively Parallel RNA Sequencing Identifies a Complex Immune Gene Repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS One* 7, 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0033091

- Piano, A., Asirelli, C., Caselli, F., Fabbri, E., 2002. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress Chaperones* 7, 250–257.
- Piano, A., Valbonesi, P., Fabbri, E., 2004. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress Chaperones* 9, 134–142.
- Regoli, F., Giuliani, M.E., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 93, 106–117. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.marenvres.2013.07.006
- Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31, 143–164. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/0166-445X(94)00064-W
- Renault, T., Faury, N., Barbosa-Solomieu, V., Moreau, K., 2011. Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 725–735. doi://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.02.004
- Rola, R.C., Monteiro, M. da C., Reis, S.R. da S., Sandrini, J.Z., 2012. Molecular and biochemical biomarkers responses in the mussel *Mytilus edulis* collected from Southern Brazil coast. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 766–771. doi://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.01.004
- Ruiz, P., Orbea, A., Rotchell, J.M., Cajaraville, M.P., 2012. Transcriptional responses of cancer-related genes in turbot *Scophthalmus maximus* and mussels *Mytilus edulis* exposed to heavy fuel oil no. 6 and styrene. *Ecotoxicology* 21, 820–831. doi:10.1007/s10646-011-0843-6
- Salaun, B., Romero, P., Lebecque, S., 2007. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 37, 3311–3318. doi:10.1002/eji.200737744
- 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. doi:10.1016/S0166-445X(01)00232-6
- Schmidt, M., Raghavan, B., Mller, V., Vogl, T., Fejer, G., Tchaptchet, S., Keck, S., Kalis, C., Nielsen, P.J., Galanos, C., 2010. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat. Immunol.* 11, 814–819.

- Scott, D.W., Mutamba, S., Hopkins, R.G., Loo, G., 2005. Increased GADD gene expression in human colon epithelial cells exposed to deoxycholate. *J. Cell. Physiol.* 202, 295–303.
- Smith, T.R., Tremblay, G.C., Bradley, T.M., 1999. Hsp70 and a 54 kDa protein (Osp54) are induced in salmon (*Salmo salar*) in response to hyperosmotic stress. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 284, 286–298.
- Son, Y.-O., Lee, J.-C., Hitron, J.A., Pan, J., Zhang, Z., Shi, X., 2009. Cadmium induces intracellular Ca<sup>2+</sup>-and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent apoptosis through JNK-and p53-mediated pathways in skin epidermal cell line. *Toxicol. Sci.* kfp259.
- Song, S.-Y., Bae, C.H., Choi, Y.S., Kim, Y.-D., 2016. Cadmium induces mucin 8 expression via Toll-like receptor 4-mediated extracellular signal related kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in human airway epithelial cells. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 6, 638–645. doi:10.1002/alr.21705
- Tamura, R.E., de Vasconcellos, J.F., Sarkar, D., Libermann, T.A., Fisher, P.B., Zerbini, L.F., E Tamura, R., F de Vasconcellos, J., Sarkar, D., A Libermann, T., B Fisher, P., F Zerbini, L., 2012. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Curr. Mol. Med.* 12, 634–651.
- Taylor, D.A., Nair, S. V, Thompson, E.L., Raftos, D.A., 2015. Dose-dependent effects of metals on gene expression in the sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Environ. Toxicol.* 30, 989–998. doi:10.1002/tox.21972
- Team, Rs., 2015. RStudio: Integrated Development for R. <br> [WWW Document]. URL <http://www.rstudio.com/>
- Thévenod, F., 2009. Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 221–239. doi:10.1016/j.taap.2009.01.013
- Wang, S., Peatman, E., Liu, H., Bushek, D., Ford, S.E., Kucuktas, H., Quilang, J., Li, P., Wallace, R., Wang, Y., Guo, X., Liu, Z., 2010. Microarray analysis of gene expression in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) reveals a novel combination of antimicrobial and oxidative stress host responses after dermo (*Perkinsus marinus*) challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 921–929. doi://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.035
- Yang, Z., Lu, W., Long, Y., Bao, X., Yang, Q., 2011. Assessment of heavy metals contamination in urban topsoil from Changchun City, China. *J. Geochemical Explor.* 108, 27–38. doi://dx.doi.org/10.1016/j.gexplo.2010.09.006



You, L., Ning, X., Liu, F., Zhao, J., Wang, Q., Wu, H., 2013. The response profiles of HSPA12A and TCTP from *Mytilus galloprovincialis* to pathogen and cadmium challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 343–350.

Zanette, J., Goldstone, J. V, Bainy, A.C.D., Stegeman, J.J., 2010. Identification of CYP genes in *Mytilus* (mussel) and *Crassostrea* (oyster) species: first approach to the full complement of cytochrome P450 genes in bivalves. *Mar. Environ. Res.* 69, S3.

Zanette, J., Jenny, M.J., Goldstone, J. V, Parente, T., Woodin, B.R., Bainy, A.C.D., Stegeman, J.J., 2013. Identification and expression of multiple CYP1-like and CYP3-like genes in the bivalve mollusk *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 128, 101–112.

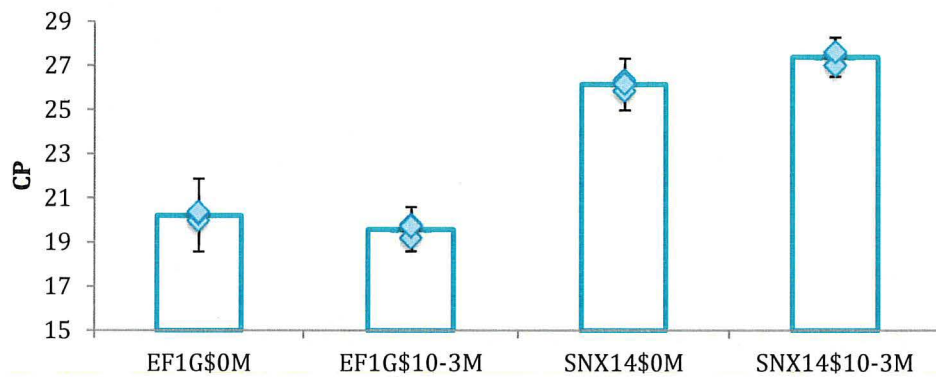
## 2.6 Supplementary data

S1: Equation to calculate the efficiency and the  $\log_2FC$  (gene expression)

$$Efficiency = \left( 10^{-\frac{1}{slope}} - 1 \right) * 100$$

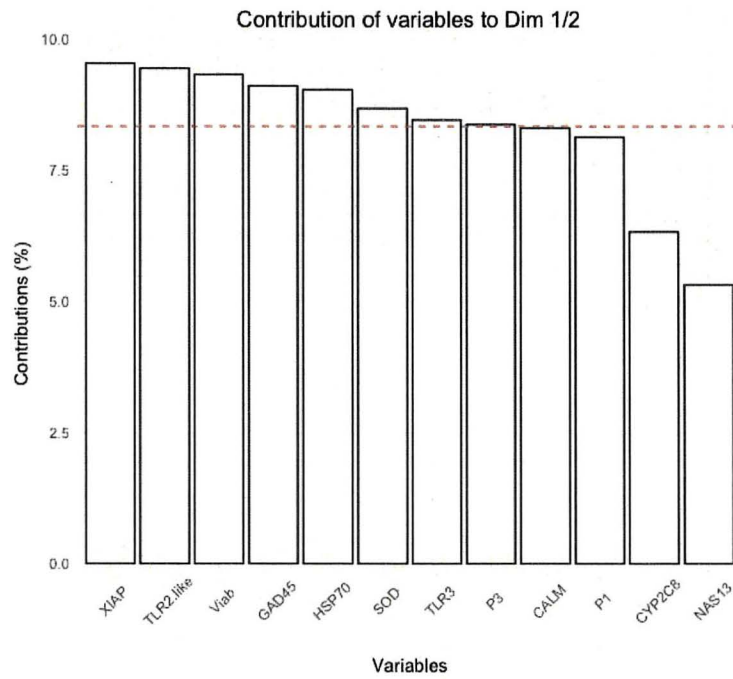
$$\log_2 FC = \log_2 \left( \frac{2^{(-\Delta Ct)} \text{ of cadmium exposed samples}}{2^{(-\Delta Ct)} \text{ of non - exposed samples}} \right)$$

S2: Housekeeping genes expression



CP values of housekeeping genes. Bar plots: mean (of all CP values) + SD; diamond: mean of CP obtained for each RT-qPCR

### S3: Contribution of vector in the PCA analysis



Contribution represent the average of contribution of each vector for both dimension:

$$\text{Contribution to Dim 1/2} = (C1 * \text{Eig1}) + (C2 * \text{Eig2})$$

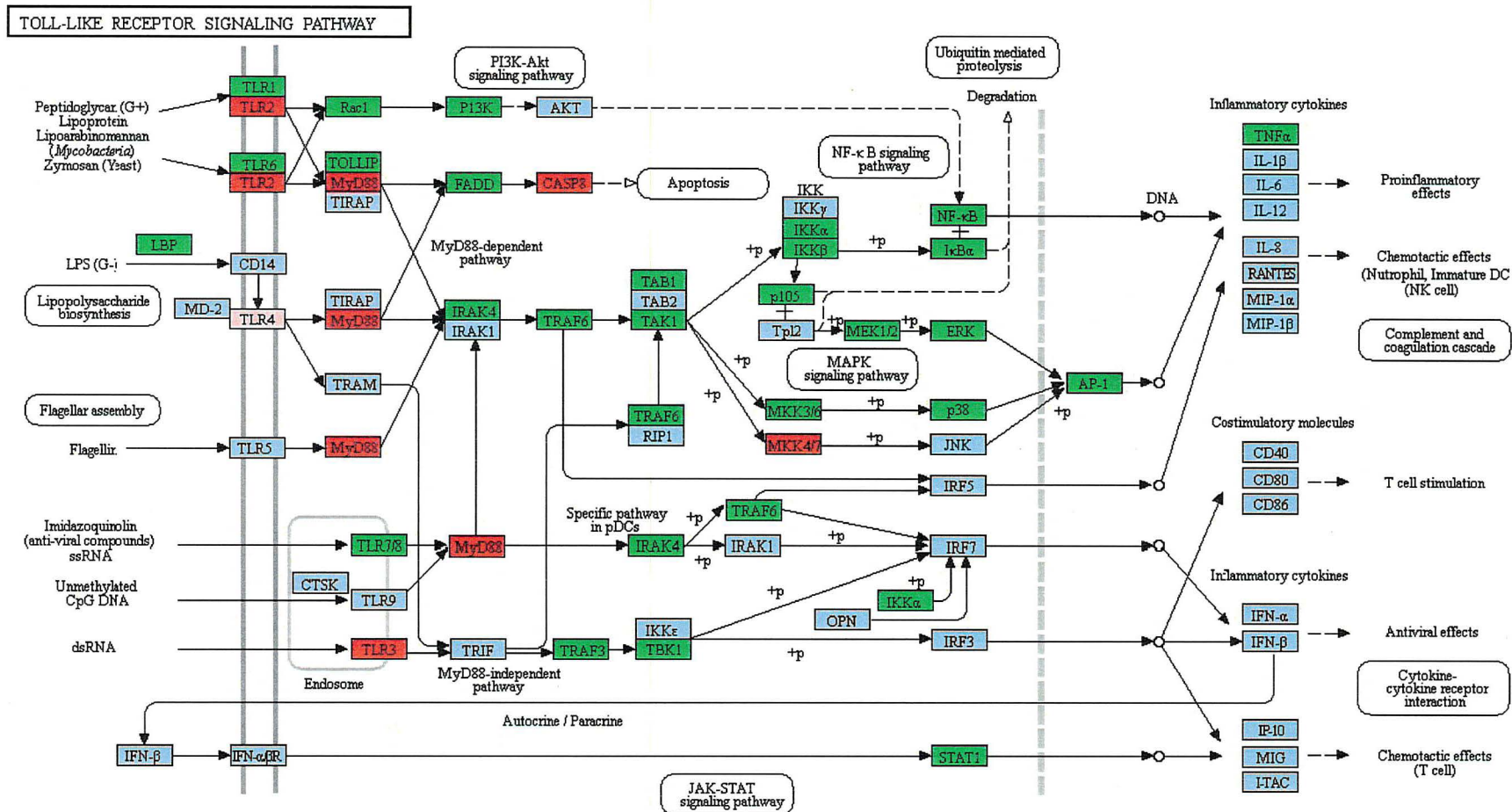
C1/C2= contribution of variable to Dim1 (C1) and Dim 2 (C2)

Eig1/2= eigenvalues of C1 and C2 respectively.



**S4: Toll-like receptor pathways induced by cadmium in *M. edulis* hemocytes**

Red boxes = up-regulated genes; green boxes = transcripts found in the whole *M. edulis* transcriptome; pink box (TLR4) = down-regulated transcript and blue boxes = KEGG regular pathway.



## **CHAPITRE V**

### **DISCUSSION GÉNÉRALE**

Dans cette étude nous nous sommes intéressés, d'un point de vue mécanistique, aux effets du Cd sur le système immunitaire de la moule bleue. Notre hypothèse de départ était la suivante

**« Le Cd peut moduler l'expression des gènes impliqués dans le système immunitaire de la moule bleue, *M. edulis* ».**

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons dans un premier temps mis en place un modèle *in vitro* en utilisant les cellules du système immunitaire de la moule. Ce modèle a été fait pour étudier les effets du Cd sur la principale fonction des hémocytes : la phagocytose. En se basant sur les résultats obtenus, une approche transcriptomique a été utilisée pour explorer le transcriptome des hémocytes. Cette approche a permis de mettre en avant la modulation de certains gènes permettant le bon fonctionnement du processus phagocytaire (et ainsi de la défense immunitaire de l'organisme). Dans cette section, nous aborderons la mise en place du modèle *in vitro* et les effets du Cd sur les hémocytes. Puis nous survolerons le transcriptome des hémocytes tout en incluant les effets du Cd sur certains des marqueurs moléculaires immunitaires spécifiques non présentés et présentés dans les chapitres précédents.



# 1 LES EFFETS DU CADMIUM SUR LES FONCTIONS HÉMOCYTAIRES : MISE EN PLACE D'UN MODÈLE *IN VITRO*.

Les modèles *in vitro* sont des outils performants pour étudier les effets globaux d'une substance ou les effets sur des fonctions/systèmes particuliers. Ces modèles permettent de déterminer le niveau de contamination, de générer des courbes dose-réponse, d'évaluer la toxicité d'un contaminant, de développer des outils analytiques, et ainsi fournir des résultats rapides mais simples (interprétations basiques).

Dans notre étude, le but du modèle *in vitro* était de déterminer la concentration de Cd qui affecterait directement les fonctions phagocytaires des hémocytes sans engendrer une mortalité importante.

## 1.1 Concentration de cadmium

Les concentrations de cadmium utilisées dans notre étude ont été sélectionnées en se basant sur de préalables études publiées par Brousseau et al., 1999; Fournier et al., 2002, 2000; Sauvé et al., 2002. Nous avons testé plusieurs concentrations (allant de  $10^{-9}$  M jusqu'à  $10^{-2}$  M) avec des concentrations intermédiaires (Annexe V). Nous n'avons pas obtenu de réponse significative pour la phagocytose pour les concentrations de Cd entre  $10^{-9}$  M et  $10^{-5}$  M ni pour  $10^{-4}$  M et  $5 \cdot 10^{-4}$  M. À une concentration de  $10^{-2}$  M, l'inhibition de la phagocytose (d'environ 80%) est accompagnée par une diminution de la viabilité très importante avec plus de 60% de mortalité cellulaire (Annexe V). Cette forte mortalité indique que les processus mis en place par les cellules sont plutôt des processus de survie ou d'apoptose. A cette concentration nous ne pouvons donc plus cibler la phagocytose. Cette concentration est donc trop forte et implique d'autre processus non phagocytaires, tandis qu'à  $10^{-4}$  M et  $5 \cdot 10^{-4}$  M aucun effet n'a été observé. C'est pourquoi pour notre approche mécanistique nous avons sélectionné la concentration de  $10^{-3}$  M (chapitre III). Des résultats similaires sont observés pour différents bivalves exposés *in vitro* à différents métaux (Tableau 7).

Tableau 7 : Effets *in vitro* du Cd sur les hémocytes provenant de différents bivalves

Espèce	Concentration	Phagocytose	% de mortalité	IC50 phagocytose	Reference
<b>M. arenaria</b>	10 <sup>-4</sup> M et 10 <sup>-3</sup> M	↓ 20%	≈ 50%	6.9*10 <sup>-5</sup> M	(Brousseau et al., 1999)
<b>M. edulis</b> <b>M. arenaria</b> <b>M. polynyma</b> <b>E. complanata</b> <b>D. polymorpha</b>	10 <sup>-3</sup> M	↓ 20% ↓ 30% ↓ 35% ↓ 50% ↓ 80%	- - - - -	>10 <sup>-3</sup> M >10 <sup>-3</sup> M >10 <sup>-3</sup> M 1.2*10 <sup>-3</sup> M 4.7*10 <sup>-4</sup> M	(Sauvé et al., 2002)
<b>M. edulis</b> <b>A. ater</b>	10 <sup>-4</sup> M et 10 <sup>-3</sup> M	↓ 75% - 50% ↓ 75% - 50%	≈ 35%	-	(Caza et al., 2015)
<b>D. polymorpha</b>	5*10 <sup>-5</sup> et 10 <sup>-3</sup> M	↓ 55% to 75%	≈ 20 % (EC50 = 4.7*10 <sup>-3</sup> )	3.71*10 <sup>-4</sup> M	(Evariste et al., 2017)

Comme nous pouvons le constater dans le tableau, les IC50 (concentration inhibant l'activité phagocytaire à 50%) pour les différentes espèces varient autour de 10<sup>-4</sup>M et 10<sup>-3</sup>M. Dans notre étude (chapitre III), la phagocytose a été inhibée d'environ 53% pour 10<sup>-3</sup>M accompagnée d'une mortalité cellulaire de 40%. D'un point de vue écologique, les concentrations utilisées dans notre étude et dans les études préalables présentées dans le tableau 4, ne sont pas de la même grandeur. En effet les doses utilisées dans les études sont plus importantes que les doses retrouvées chez les bivalves (chapitre I - Fig. 11). Cependant, pour des modèles d'exposition et pour des analyses mécanistiques, des concentrations engendrant des effets doivent être appliquées. C'est pourquoi les concentrations sont utilisées pour mettre en avant de nouveaux biomarqueurs.

## 1.2 Milieu et temps d'exposition

De nombreuses études utilisent une exposition directe des hémocytes. En effet, les hémocytes de bivalves sont directement prélevés de l'organismes et mis en contact avec les contaminants ou des échantillons environnementaux (Bouchard et al., 1999; Brousseau et al., 1999; Fournier et al., 2002). Ce mode d'exposition a été étudié plus en profondeur par Sauvé et ses collaborateurs (Sauvé et al., 2002). Ces derniers ont mesuré l'impact des différents milieux de culture cellulaire sur les capacités phagocytaires et la viabilité cellulaire des hémocytes de la myes commune, *M. arenaria*. Ils ont aussi étudié la cinétique des fonctions hémocytaires sur 24h (Annexe VI). Leurs résultats mettent en avant deux aspects importants que nous avons pris en compte pour notre modèle : 1) le milieu de culture qui favorise la phagocytose est le milieu d'origine des cellules, c'est à dire l'hémolymphe (*a contrario* des milieux tels que RPMI-1640) et 2) le pic de l'activité phagocytaire s'obtient autour de 18h d'exposition avec une diminution au bout de 21h. Ces derniers résultats indiquent que pour étudier la phagocytose, le temps d'exposition optimal est 18h-21h.

Basé sur ces résultats nous avons exposé les hémocytes de moules au cadmium pendant 21h (le temps optimal pour la phagocytose) dans leur propre milieu (l'hémolymphe).

Le modèle *in vitro* mis en place dans notre étude nous a permis de choisir avec précision la concentration d'exposition d'hémocytes pour notre approche transcriptomique. Les hémocytes présentant des modifications fonctionnelles sont les cellules exposées à  $10^{-3}$ M. Notre modèle nous a donc permis de sélectionner deux concentrations, 0M et  $10^{-3}$ M, pour étudier les processus moléculaires *via* la transcriptomie et l'analyses du transcriptome des hémocytes de *M. edulis* exposés au Cd.



## 2 LES EFFETS DU CADMIUM AU NIVEAU MOLÉCULAIRE SUR LES PROCESSUS PHAGOCYTAIRES ET IMMUNITAIRES

Les effets du Cd sur les fonctions hémosteaires ont été présentés dans les chapitres III, IV et V. Dans ce chapitre nous avons essayé d'identifier les transcrits associés à ces fonctions.

Nous avons porté une attention particulière aux transcrits impliqués dans la phagocytose. C'est un processus qui implique plusieurs étapes telles que la migration des hémosteaires vers le site infecté ou l'agent étranger ; la reconnaissance de l'agent étranger (par les senseurs de pathogène) ; l'endocytose et l'internalisation (nommée phagocytose) de l'agent (qui implique la migration du lysosome et la formation du phagolysosome) et la destruction de l'agent étranger. Nous discuterons ici des résultats obtenus aux différentes étapes de la phagocytose incluant ainsi la mobilité cellulaire, la reconnaissance des pathogènes, les voies de signalisations cellulaires, mais aussi de la cytotoxicité et de la génotoxicité du Cd.

### 2.1 La migration des hémosteaires

Dans notre étude, nous avons identifié les effets du Cd sur des gènes participant à la migration hémosteaire. La première étape est l'activation des cellules phagocytaires lorsque des corps étrangers sont détectés par des PRRs. Les cellules immunitaires, qui sont mobiles, vont migrer vers le site infecté (Canesi et al., 2002; Cheikh Yosra et al., 2016). La migration cellulaire implique principalement quatre étapes bien décrites par Rioult, 2013. Cependant la clé de la migration et de l'endocytose est le réarrangement du cytosquelette de la cellule. Le cytosquelette des hémosteaires est principalement composé de filaments d'actine (Gómez-Mendikute and Cajaraville, 2003). L'un des premiers événements moléculaires lors de l'initiation de la migration est l'intense polymérisation de l'actine. Celle-ci va se concentrer sur la périphérie membranaire et va permettre, avec plusieurs autres molécules telles que CDC42, l'élongation et la formation de pseudopodes (qui permettent, en plus de la migration, l'endocytose puis la phagocytose). Dans notre étude, 71 « nombres orthologues (KO) » ont été associés à la régulation de l'actine du cytosquelette (Annexe VII), parmi lesquels trois ont été surexprimés dans les hémosteaires exposés au Cd : *F-actin*, *CDC42* et *APC*. Dans le chapitre III nous avons abordé les effets du Cd sur l'actine et sur *CDC42*.

En effet, il a été mis en avant que le Cd pouvait provoquer la dépolymérisation des filaments d'actine empêchant ainsi la formation de protrusion ainsi que le remaniement du cytosquelette (Franchi and Ballarin, 2013; Gómez-Mendikute and Cajaraville, 2003; Matozzo et al., 2001).

La ramification et la polymérisation de l'actine sont entraînées par l'activation du complexe *Arp2/3* dont l'activité est réglementée par les Rho GTPases, *RAC* et *CDC42*. L'*Arp2/3* ainsi que *CDC42* ont, tous les deux, été identifiés dans le transcriptome des hémocytes.

Le rôle de *CDC42* dans l'activité phagocytaire n'a pas été décrit chez les bivalves mais a été abordé dans le chapitre III. Les protéines de la famille Rho, dont *CDC42* fait partie, sont impliquées, non seulement dans la régulation de l'actine, mais aussi dans la formation des phagosomes et la formation des pseudopodes (Li et al., 2015; Nayak et al., 2013). En plus de ces fonctions, le *CDC42* joue un rôle pivot dans l'activation du récepteur Fcy (*FcyR*-mediated phagocytosis), dans l'activation de la voie PI3K ainsi que la voie des MAPK kinase (« *c-Jun N-terminal kinases (JNK)* » et *p38*) (Granger Joly de Boissel et al., 2017). Même si la voie *FcyR* n'a pas été observée chez *M. edulis*, 32 membres de celle-ci ont été identifiés (Annexe VIII). Chez la coquille Saint Jacques, il a aussi été mis en avant la présence de transcrits prenant part à cette voie (Peng et al., 2015). Nos résultats suggèrent que cette voie peut être présente chez les mollusques mais son rôle et son fonctionnement restent encore mal connus.

Nous avons aussi observé que deux gènes codant pour des molécules jouant un rôle essentiel dans les interactions entre les cellules et la « *matrix extracellulaire (ECM)* » ont été induits par le Cd. Ces résultats ont superficiellement été abordés dans le chapitre III et IV. Les interactions entre l'ECM et les cellules permettent la migration des cellules vers les sites d'infections *via* la formation de site d'adhésion focaux. Ces sites sont composés par plusieurs molécules telles que le collagène, les laminines, les intégrines ou encore les « *thrombospondines (TPS)* ». Il existe cinq TPS (TPS-1 à 5), dont la TPS-5 (connue aussi sous le nom de COMP). Les TPS sont des glycoprotéines matricielle (qui interagissent avec les autres composants et assurent la liaison cellule-ECM) dépendantes du calcium qui modulent le comportement cellulaire, la cicatrisation des plaies et l'induction du système immunitaire (Sun et al., 2006; Tan and Lawler, 2009). Leur rôle chez les bivalves est mal connu mais il semblerait que TPS-5 pourrait activer la voie alternative et le système complémentaire du système immunitaire (Happonen et al., 2012, 2010). Dans notre étude, le gène de TPS-5 a été induit par le Cd (chapitre III).

Une induction pourrait indiquer plusieurs effets : 1) la perte de ECM et des interactions cellule-ECM ce qui impliquerait une diminution de la migration de cellule vers le site infecté ou vers la plaie d'où une sur expression de TPS-5 pour compenser ces pertes 2) l'induction du système complémentaire afin de protéger l'organisme. Il a été démontré qu'une mauvaise dégradation des ECM est associée à de nombreuses maladies chez les mollusques (Ziegler et al., 2002). Les « métalloprotéines matricielle (MMPs) » sont un groupe enzymatique qui ont pour rôle de dégrader les composants des ECM pour permettre le renouvellement de celle-ci (Mannello et al., 2001). Les MMPs ont été identifiées dans les hémocytes de *C. virginica* (Ziegler et al., 2002), *M. galloprovincialis* Lam (Mannello et al., 2001), *P. fucata* (Kubota et al., 2017) et chez l'huitre *C. gigas* (Takagi et al., 2004). Dans notre étude, nous avons identifié 32 transcrits codant pour différentes MMPs, dont un codant pour la NAS13. Ce transcrit a été surexprimé dans les hémocytes exposés au Cd (chapitre III et IV).

L'induction de NAS13 peut être due à plusieurs facteurs : 1) soit le Cd induit des effets sur les cellules et sur la production d'ECM ce qui provoque une surexpression de NAS13 pour augmenter le renouvellement de la ECM afin de maintenir un équilibre et une bonne mobilité cellulaire ; 2) soit le Cd interagit directement avec l'enzyme NAS13. En effet, les MMPs sont des protéines dépendantes du zinc et du calcium et possédant un site de liaison métallique (Mannello et al., 2001; Ziegler et al., 2002). Comme il a été mis en avant dans le chapitre I, le Cd présente de forte similitude avec le calcium et peut aussi se lier aux sites de liaisons métallique. Nous pouvons supposer que NAS13 pourrait avoir un rôle similaire au métallothioneine en fixant ainsi le Cd ce qui diminuerait sa disponibilité et par conséquent sa toxicité. Dans notre publication présentée dans le chapitre IV, nous avons validé l'expression du gène de NAS13. L'expression de ce gène chez les bivalves ne semble pas avoir été étudiée précédemment. Même si l'expression des gènes pour l'Act et la TPS-5 n'a pas pu être validée par RT-qPCR, nous pensons que ces protéines ont un rôle fondamental dans le processus de la phagocytose en participant à la mobilité cellulaire, la migration des hémocytes, le réarrangement du cytosquelette et la formation de pseudopodes. Cependant, des études plus spécifiques seraient nécessaires pour mieux comprendre les effets des métaux bivalents sur les processus de mobilité cellulaire liés à la phagocytose.



## 2.2 La reconnaissance des pathogènes

Après cette phase migratoire menant au site d'infection, les phagocytes se lient à l'élément à phagocyter. Cette liaison se fait grâce à la reconnaissance des PAMPs par les PRR. Dans notre étude, nous avons identifiés plusieurs senseurs de pathogènes tels que les TLRs, les lectines, les récepteurs de Scavengers, les LBPs et les RLRs. L'analyse du transcriptome a ainsi permis d'identifier 323 séquences codant pour les différents TLRs existants. Trois gènes codant pour des TLRs (TLR2-like, TLR3 et TLR4-like) ont été induits par le Cd dans les hémocytes de moules. Les effets du Cd ont été abordés dans les chapitres III et IV. Les gènes TLR2-like et TLR3 ont été surexprimés tandis que le gène TLR4-like a été inhibé par la présence de Cd. De récentes études ont mis en avant une diminution d'un TLR chez *M. galloprovincialis* co-exposée à une nanoparticule de TiO<sub>2</sub> et au Cd (100mg/L) ainsi qu'une surexpression des gènes codant pour TLR 1-4 et TLR7/8 dans les branchies exposées au cuivre chez *Mizuhopecten yessoensis* (*M. yessoensis*) (Meng et al., 2014). Autrement, la plupart des études évaluant les effets des métaux sur les TLRs ont été réalisées sur des lignées cellulaires humaines ou de souris. Cependant, l'activation des TLRs est aussi dépendante de ligands exogènes tels que l'HSP60 ou l'HSP70 et endogènes tels que les bactéries, les virus, etc (Ertl et al., 2016).

Les TLRs sont responsables de la reconnaissance des PAMPs et d'activer des mécanismes moléculaires tels que la voie moléculaire des TLR. La voie des TLR peut être dépendante de MyD88 ce qui mène à la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF, l'IL-1 ou l'IL-6) avec une activation rapide des voies de NF- $\kappa$ B, MAPK et AP1, ou indépendante de MyD88, qui est associée à l'induction de interférons. Cette voie (dépendante ou indépendante de MYD88) commence par la dimérisation des TLRs et le recrutement de récepteurs spécifiques. Actuellement, cinq adaptateurs ont été identifiés : le MyD88, MAL/TIRAP, TRIF/TICAM, TRAM et SARM1 (Ertl et al., 2016; Kutikhin and Yuzhalin, 2013). Dans notre étude, 32 composants de cette voie moléculaire ont été identifiés dont 7 (incluant trois TLRs) modulés par le Cd (Annexe IX).

Des cinq récepteurs, MAL/TIRAP, TRIF et TRAM n'ont pas pu être identifiés. Bien que MAL semble jouer un rôle primordial dans la voie moléculaire des TLR, ce dernier n'a pas été identifié dans notre étude, en accord avec les résultats déjà obtenus pour *M. edulis*, *Strongylocentrotus purpuratus* (Hibino et al., 2006; Philipp et al., 2012) et chez *S. glomerata* (Ertl et al., 2016). De la voie indépendante de MYD88, les composants TRAM, TRAF3, TBK1 ainsi qu'avec plusieurs IRF ont été identifiés chez *M. edulis* (Philipp et al., 2012).

Dans notre étude nous avons aussi mis en avant la présence de TRAM, TRAF3, TBK1, ainsi que IKK3. Cependant, la voie indépendante de MYD88 est activée par le récepteur TRIF, non identifié dans notre transcriptome. Bien que la plupart des gènes de la voie indépendante aient été identifiés, il ne semblerait pas que le Cd active cette voie moléculaire. La voie dépendante de MYD88, quant à elle, a été activée par le Cd avec une surexpression du récepteur MYD88. La surexpression de ce gène par le Cd (logFC d'environ 2.5) a aussi été mise en évidence par Zhang et ses collaborateurs (2016) dans les branchies de *C. farreri*. L'activation de MYD88 peut mener, après implication de nombreuses molécules, à l'activation des voies de signalisation tels que MAPK, NF- $\kappa$ B ou autre qui induiront des molécules effectrices.

Les RLRs font eux aussi partie des PRRs présents chez les bivalves. Bien qu'il en existe trois types, nous n'avons pu identifier que deux dans le transcriptome de la moule, RIG-1 et MDA5, dont un induit par le Cd (RIG-1). Comme pour les TLRs, très peu d'études ont rapporté les effets du Cd sur ce PRRs chez les bivalves. Néanmoins, Meng et ses collaborateurs (2014) ont observé une sous expression de ce même gène dans les branchies exposées au cuivre chez *M. yessoensis*. Bien que seul RIG-1 ait été induit, nous avons mis en avant 22 composants de la voie des récepteurs RIG-1. Cependant le gène central de cette voie, MAVP/IPS1, n'a pas été identifié.

En plus des TLRs et RLRs, d'autres PRRs ont aussi été identifiés dans le transcriptome des hémocytes exposés *in vitro* au Cd. Nous avons pu mettre en évidence dix-sept transcrits codant pour les récepteurs de Scavenger, deux transcrits codant pour un récepteur LBP, 215 transcrits codant pour des lectines (incluant principalement des lectines de type C mais aussi des galectines et des lectines de type F) et 110 pour les protéines « *fibrinogen-related (FREP)* ». Cependant, le Cd n'a pas eu d'effet sur ces différents récepteurs. Il existe très peu d'étude sur les effets des métaux sur ces récepteurs. Néanmoins, il a été mis en avant que la combinaison entre le Cd et une augmentation de la pression de CO<sub>2</sub> provoquera une diminution de l'expression d'une lectine de type C dans les hémocytes de la palourde et chez l'huître (Ivanina et al., 2014).

La validation de la surexpression des TLRs dans les hémocytes de moule, de 20 fois et 50 fois pour TLR2 et TLR3, présentée dans le chapitre IV, est également une première chez les bivalves. Même si l'expression de TLR4 et RIG-I n'a pas pu être validée par RT-qPCR, ces gènes sembleraient être inhibés par le Cd. Il ne faut pas oublier que les composants des voies moléculaires identifiés ici peuvent être aussi impliqués dans d'autres voies moléculaires, telles que l'autophagie ou l'apoptose. Cependant, nous suggérons des études plus approfondies sur les effets du Cd sur ces senseurs de pathogènes.

Comme la voie des TLRs et la reconnaissance des pathogènes par les senseurs résultent dans l'activation de facteur de transcription NF- $\kappa$ B, IRF, JAK/STAT et MAPK (Luo et al., 2015), nous nous sommes donc intéressés à ces voies moléculaires.

## 2.3 Les voies de signalisation cellulaires

Les voies de signalisation cellulaire, décrites dans le chapitre I, menant à l'activation des réponses immunitaires de l'hôte peuvent être activées par les senseurs de pathogène préalablement décrits.

### 2.3.1 La voie NF- $\kappa$ B

Les effets directs du Cd sur la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B chez les bivalves n'ont pas encore été étudiés. Cependant l'activation ou l'inhibition des NF- $\kappa$ B par plusieurs métaux a été rapporté pour de nombreuses cellules. Des études *in vitro* sur différents types de cellules ont démontré que le Cd et d'autre métaux divalents (mercure, l'arsenic, cuivre) pouvaient empêcher la liaison de NF- $\kappa$ B avec l'ADN, inhibant ainsi la transcription des gènes (Dieguez-Acuña et al., 2004; Mathas et al., 2003; Shumilla et al., 1999; Uzzo et al., 2002; Xie and Shaikh, 2006). NF- $\kappa$ B existe sous deux formes (homodimère ou d'un hétérodimère) et est composé de deux subunités p50 et p65 associées à l'inhibiteur kappa (I- $\kappa$ B). La translocation du complexe p50/p65/I- $\kappa$ B vers le noyau est essentielle pour l'initiation de la transcription des effecteurs immunitaires (Schoonbroodt and Piette, 2000). Dans notre transcriptome, nous avons identifiés 27 composants de cette voie de signalisation (Annexe X), notamment avec l'induction de MYD88, TLRs, ainsi que des inhibiteurs d'apoptose. Cependant, l'expression des principales sous-unités (p60, p65 et I- $\kappa$ B) n'a pas été modulée par le Cd.

L'identification de ces sous-unités indique néanmoins que cette voie existe chez les bivalves et qu'elles jouent probablement un rôle primordial dans la protection des organismes face aux pathogènes, comme suggéré par plusieurs (Huang et al., 2012; Moreira et al., 2012; Moreira et al., 2012; Philipp et al., 2012).



### 2.3.2 La voie des IRFs

Une autre voie de signalisation, activée principalement par la voie indépendante de MYD88, est la voie IRF. Cette voie a été très peu étudiée chez *M. edulis*. Philipp et ses collaborateurs (2012) ont mis en évidence cinq transcrits codant pour des IRFs. Or, dans notre étude, nous n'avons pas pu identifier des IRFs.

### 2.3.3 La voie MAPK

La voie de transduction des MAPK est constituée par une famille de kinases à sérines/thréonines. Son activation peut se faire par des signaux tels que des PRRs, dont les TLRs, et des cytokines, et tels que le TNF et l'interleukine-1 (IL-1). Des études antérieures ont démontré que la voie MAPK était impliquée dans la mort cellulaire induite par une exposition au Cd (Låg et al., 2005). Dans notre étude, 80 composants de cette voie ont été identifiés dont seulement cinq composants induits par le Cd. Il a aussi été expliqué dans le chapitre V que CDC42 pouvait avoir un rôle clé dans l'activation des MAPKs. Cependant, aucun composant principal tel que les TNFR, IL, ou autre n'a été induit par le Cd. Nous pouvons donc en déduire que cette voie ne semble pas être impliquée dans les mécanismes de défense cellulaire après une exposition au Cd.

En résumé, l'étude du transcriptome des hémocytes de *M. edulis* exposés au Cd nous a permis de mettre en avant de nombreux transcrits associés à des voies de signalisation connues pour moduler l'expression des effecteurs immunitaires. Cependant, aucun ne semble être induit par le Cd malgré la présence de nombreux transcrits. Il est donc probable que ces voies n'ont pas été modulées par le Cd et que d'autres processus ou mécanismes d'action ont été mis en place par les cellules. Néanmoins, il existe un réel manque de compréhension de la part des scientifiques sur l'induction et les interactions de ces voies avec les métaux.

## 2.4 Les effecteurs immunitaires

Lorsque les senseurs de pathogènes reconnaissent des corps étrangers, ils activent les voies de signalisation afin que certaines molécules soient larguées dans le phagocyte et/ou dans le milieu intra-extracellulaire. Ces molécules ont comme rôle principal la destruction du corps étranger. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre I, il existe plusieurs familles ayant des rôles bien différents.

### 2.4.1 Peptides antimicrobiens (AMPs)

Les PAMs sont des molécules riches en cystéines ayant des fonctions antibiotiques (LvYun et al., 2013). Les PAMs peuvent être véhiculés par l'hémolymphe (Soudant et al., 2013) et il en existe plusieurs comme nous l'avons décrit dans le chapitre I. Nous avons réussi à identifier 45 transcrits codant pour les sept différents types de PAMs. Parmi ces 45 transcrits nous avons identifié cinq mytichines et cinq mytillines, qui sont des PAMs récemment identifiés chez *M. coruscus* et connus pour leur affinité pour les bactéries à gram positif et les champignons (Qin et al., 2014). Cependant, nous n'avons identifié aucun transcrit codant pour les PAMs dans les hémocytes exposés au Cd.

### 2.4.2 Le système proPo

La phénoloxydase (PO) est une enzyme riche en cuivre et elle fait partie du système prophenoloxydase (proPO). Fait surprenant, dans notre étude, aucun composant du système proPO n'a été identifié dans le transcriptome des hémocytes de *M. edulis*. Des études ont cependant montré une surexpression du gène proPo par l'ammoniac (Le Moullac and Haffner, 2000) et une répression de ce même gène chez l'écrevisse *Procambarus clarkii* après une exposition au cuivre (Wei and Yang, 2016). Une diminution de l'expression du gène *proPO* a été mesurée chez les hémocytes de crabe par (Zhou et al., 2017) après une exposition au Cd. De même l'activité de PO a été inhibée par le Cd et le nickel chez la crevette *Litopenaeus vannamei* (Bautista-Covarrubias et al., 2014) et chez le crabe *Scylla serrata* (Vijayavel et al., 2009) respectivement. Nous pensons que l'absence de PO et des gènes impliqués dans le système proPO peut être dû à la méthodologie d'assemblage et d'annotation des transcrits. En effet, le peu de données disponibles pour les transcrits de bivalves peut avoir influencé l'assemblage et

l'annotation des transcrits. Peut-être serait-il judicieux de faire des analyses des transcrits et de leur annotation de façon un peu plus approfondies et d'essayer d'annoter les transcrits qui n'ont pas été annotés dans notre analyse bio-informatique?

### 2.4.3 Cytokines et leurs récepteurs

Les cytokines sont des molécules responsables de l'inflammation lors d'un stress cellulaire. Elles sont notamment induites lors de la reconnaissance des pathogènes par les TLRs et les PRRs intracellulaires. Elles régulent aussi les activités physiologiques comme le développement ou la réparation tissulaire. Lors des analyses du transcriptome des hémocytes, nous avons pu identifier de nombreux transcrits appartenant aux différents types de cytokines. Nous avons mis en évidence trois transcrits pour des suppresseurs de cytokines, 49 transcrits pour les interleukines (dont huit récepteurs), sept transcrits codant pour les MIF, 42 transcrits pour les TNFs (dont six TNFS, quatre LITAF, 19 récepteurs et 13 TRAF) et neuf facteurs de régulation des interférons. D'après certains, les interférons et les chémokines n'ont pas été identifiés chez les bivalves bien que ces derniers possèdent les voies de signalisation et les facteurs d'induction des interférons (Gerdol & Venier 2015). **Or**, dans notre étude, nous avons identifié cinq transcrits codant pour trois chémokines différentes (CRR5, CCR6 et CCR7) et 29 transcrits pour des interférons. Ces résultats sont une première chez la moule bleue même si aucune de ces cytokines et de leur récepteur n'a été induit par le Cd après l'exposition *in vitro*.

La voie des TNFs peut être induite par d'autres cytokines cependant, cette voie ne peut se déclencher que par l'interaction entre TNF et les récepteurs TNFRs. Dans notre étude, nous n'avons identifié aucun transcrit codant pour TNF même si des transcrits pour TNFR et TRAF étaient présents. Ces résultats sont consistants avec ceux d'autres études (Philipp et al., 2012). Dans notre étude nous avons identifié 14 transcrits codant pour LITAF, bien que celui-ci n'ait pas été modulé par le Cd.



#### 2.4.4 La voie de JAK/STAT

La voie JAK/STAT est principalement induite par des cytokines. Des études ont suggéré la présence de la voie des JAK/STAT chez les bivalves, notamment chez *M. edulis* (Philipp et al., 2012). Lors des analyses du transcriptome, nous avons pu identifier 21 transcrits associés à cette voie d'induction (Annexe XI) mais aucun d'eux n'a été modulé par le Cd.

En résumé, l'identification des effecteurs moléculaires a permis de mettre en évidence la présence de ces molécules dans le système immunitaire de *M. edulis* ainsi que leur présence dans les hémocytes.

L'absence de modulation par le Cd de ces molécules est en accord avec nos résultats obtenus pour les voies de transduction. Il semblerait donc que le Cd induise plutôt d'autres voies moléculaires, telles que le système complémentaire, l'apoptose, ou encore des gènes plutôt impliqués dans la cytotoxicité du Cd.

### 3 LA PHAGOCYTOSE ET LE LYSOSOME

La phagocytose implique la migration du lysosome vers le phagosome (création du phagolysosome) afin que les enzymes présentes dans le lysosome détruisent l'agent étranger (chapitre I - Fig. 5). Il a été démontré que les hémocytes tendaient à accumuler les métaux dans le lysosome (Einsporn et al., 2009; Marigómez et al., 1990; Mason, 1983; Olabarrieta et al., 2001). Le transcriptome de *M. edulis* exposé au Cd a révélé la présence d'un grand nombre de transcrits codant pour les enzymes du lysosome, dont quatre lysozymes de type g, deux de type c et deux de type i. Néanmoins, aucun lysozyme ne semble être induit par le Cd. D'autres enzymes hydrolytiques du lysosome, ainsi que des marqueurs membranaires, ont cependant été induits (Annexe XII). Nous avons pu identifier des transcrits codant pour CD63 (LIMP), des cystinosine, des sialines, et l'heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase (pour les marqueurs membranaires) ainsi qu'une protéase (LGMN), une glucosidase (NAGLU) et une lipase (LYPLA3). La surexpression de ces marqueurs pourrait indiquer une dégradation et une perte de l'intégrité de la membrane lysosomale. À noter, les récepteurs « récepteur de mannose-6-phosphate cationin/dépendent (*IGF2R/M6RP respectivement*) » qui sont responsables du transfert des enzymes lysosomaux depuis l'appareil de Golgi vers le lysosome, ont aussi été induits par le Cd.

Bien qu'à notre connaissance les effets du Cd sur ce récepteur n'aient pas été étudiés, dans le cas de M6RP, nous pouvons suggérer que son induction découle d'une liaison entre le récepteur et le Cd divalent.

La dégradation de la membrane du lysosome pourrait évoquer une perte de ses activités, limitant la formation de phagolysosome, ce qui serait désastreux pour l'organisme car sa phagocytose ne serait pas efficace. L'induction des récepteurs responsables du transfert des enzymes depuis l'appareil de Golgi vers le lysosome peut aussi indiquer une diminution des enzymes dans l'organe et donc une efficacité moins importante. Il serait intéressant de se pencher sur le rôle du Cd sur ces enzymes.

## 4 LE SYSTÈME COMPLÉMENTAIRE

Le composant principale est C3 qui est activé grâce au facteur B. Dans notre étude, nous avons identifié un transcrite codant pour le facteur B ainsi que quatre transcrits pour C3. Classiquement, C1q est connue pour être la protéine de reconnaissance cible de la voie classique du complément, en jouant un rôle crucial dans l'immunité adaptative (Medzhitov and Janeway, 2002; Fraser et al., 2007). Nous avons pu identifier neuf transcrits pour C1q, et 300 transcrits pour des domaines protéiques contenant C1q (C1qDC). Ces résultats sont en accord avec la grande diversité préalablement observée chez les bivalves (168 transcrits trouvés chez *M. galloprovincialis*, 564 chez *M. edulis*, 321 chez *C. gigas* et 187 chez *C. virginica*). On suppose que ce grand nombre de C1q chez les bivalves serait due à l'absence du système adaptatif ce qui confirmerait l'hypothèse que le système complémentaire des mollusques pourrait être différent du système complémentaire des vertébrés (Gerdol and Venier, 2015; Gestal et al., 2010; Nonaka, 2011). Récemment, la surexpression de C1qDC a été liée à la présence de différents pathogènes chez les bivalves (Adema et al., 2010; Prado-Alvarez et al., 2009). Dans notre étude, un transcrite de C1qDC a été induit par le Cd. Des résultats similaires ont été obtenus chez *M. coruscus*. Les auteurs ont observé une augmentation de l'expression de la C1qDC après une exposition au Cd et au cuivre. Chez *M. galloprovincialis*, les hémocytes ont aussi montré une augmentation d'un C1qDC lors d'une exposition à l'argent (Gomes et al., 2013). Deux hypothèses peuvent être émises :

L'induction des C1q par les métaux peut être due à l'effet cytotoxique de ces derniers et donc à la présence du stress oxydant dans les cellules (Pytharopoulou et al., 2011)

Les protéines C1q interagissent avec les métaux divalents car ils possèdent un domaine de liaison aux métaux qui pourraient être la cible de ces derniers. Tout comme les metallothioneines, les C1q pourraient se lier au métaux et réguler ainsi l'homéostasie cellulaire (Park et al., 2001).

## 5 LE STRESS OXYDANT, LES MRP ET LES HSP

Associés avec les activités phagocytaires, la production de ROS cytotoxiques est un mécanisme général de protection chez la plupart des espèces. Par contre, lors d'une contamination par le Cd, il se crée un déséquilibre entre la génération de ROS et la production d'antioxydants (Ikediobi et al., 2004; Stohs and Bagchi, 1995). Le Cd peut entraîner une diminution de la quantité d'antioxydants (glutathion) ou de l'activité enzymatique permettant de lutter contre le stress oxydant (superoxyde-dismutase, glutathion-peroxydase, catalase) (Leonard et al., 2004). En plus du stress oxydant, le Cd peut aussi induire l'expression des gènes de stress tels que ceux codant pour les HSP ou où ceux impliqués dans la protection et de détoxification, tels que ceux codant pour les cytochrome P450 (CYP) ou les protéines de résistance aux multixenobiotiques (MXP/MRP).

Dans notre étude nous avons pu identifier 211 transcrits codant pour la  $SOD_{Cu/Zn}$ , quatre pour la  $SOD_{Mn}$  et un pour  $SOD_{Cu}$  exclusivement. Parmi les transcrits identifiés, nous avons également validés l'expression des gènes codant pour  $SOD_{Cu/Zn}$ , CYP2C8 et HSP70 dans les cellules exposées au Cd. En plus de la SOD, un des gènes codant pour la famille des glutathions a aussi été utilisé comme marqueur. Il est connu que le Cd peut induire la transcription des gènes de la glutathion-S-transférases (GST- $\alpha$  et GST- $\pi$ ). La synthèse de GSH en présence de Cd serait un mécanisme de protection dans lequel le métal se fixe aux groupements thiols du GSH, prévenant ainsi les dommages cellulaires (Hatcher et al. 1995; Shukla et al. 2000). Ces deux gènes ont d'ailleurs été induits par l'exposition au Cd chez différents bivalves (Fang et al., 2010; Hoarau et al., 2006; Koutsogiannaki et al., 2014).

Pour rejoindre les effets du Cd sur la mobilité cellulaire, il a été démontré que la présence des ROS dans les cellules est aussi responsable de la dépolymérisation des microfilaments d'actine (Jonsson et al., 2006). Dans une étude réalisée par McDonagh et ses collaborateurs, il semblerait que l'actine soit une molécule cible du stress oxydatif chez *M. edulis* (McDonagh et al., 2005). Il se peut donc que le Cd et l'induction de ROS provoquent la surexpression des gènes impliqués dans la mobilité cellulaire, tels que ceux codant pour l'actine, les TPS et les MMP.



Par ailleurs, ces gènes ont déjà été utilisés comme marqueurs moléculaires face à la contamination métallique. La validation de leur induction dans les hémocytes de moules nous permet de valider le stress dû au Cd. Il aurait paru surprenant qu'aucun marqueur traditionnel ne soit présent dans notre étude afin de consolider nos résultats. Ces résultats confirment la présence d'un stress cellulaire du au Cd.

## 6 LA GÉNOTOXICITÉ, L'APOPTOSE ET L'AUTOPHAGIE

Comme nous l'avons abordé brièvement dans le chapitre I, il est bien connu que le Cd peut induire des dommages à l'ADN et mener à l'apoptose. L'exposition au Cd résulte généralement en la génération de 8-OHdG (mutation génétique) et en une inhibition de la 8-oxoguanine-DNA glycosylase (enzyme permettant l'excision de la 7,8-dihydro-8-oxoguanine de l'ADN). Dans nos résultats, nous n'avons pas identifié de transcrite codant pour la 8-oxoguanine-DNA glycosylase. Nous avons toutefois observé l'activation de GADD45, un gène impliqué dans les réparations de l'ADN par incision nucléaire mais aussi dans le cycle cellulaire (chapitres III et IV). GADD45 est responsable de stopper le cycle cellulaire dans les phases G2/M afin d'éviter la prolifération de cellule mutée (Granger Joly de Boissel et al., 2017). Ces résultats soulèvent la possibilité que les effets génotoxique du Cd pourraient être dûs à l'augmentation de GADD45. Lorsque les dommages sont irréparables, les cellules vont activer le processus d'apoptose. L'apoptose a été abordée dans les chapitres III et IV. Il existe deux voies apoptotiques : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (ou la voie mitochondriale) (Romero et al., 2015). Les deux voies convergent vers une étape exécutive activée par le clivage de la caspase 3. Dans le transcriptome des hémocytes de *M. edulis* exposé au Cd, nous avons pu identifier 107 transcrits codant pour différentes caspases, dont les caspases 6 et 8 qui semblent avoir été induites par le Cd (chapitre III). La caspase 8 est un initiateur d'apoptose principalement activé par la famille des TNF et qui mène à l'activation de la voie intrinsèque apoptotique (Meng et al., 2014; Romero et al., 2011; Xiang et al., 2013). Des résultats similaires ont été obtenus chez des vertébrés (Fuente et al., 2002; Fujimaki et al., 2000). Chez *C. virginica* toutefois, l'apoptose induite par le Cd semble être indépendante de la voie des caspase (Sokolova et al., 2004).

En plus des caspases, de nombreux autres composants de la voie apoptotique ont été identifiés dans notre transcriptome, tels que FADD, TNF-R1, TRAF2, FasL, AIF, etc (Annexe XIII). La présence de ces différents composants valide les études déjà faites sur le processus apoptotique chez les bivalves (Kiss, 2010; Sokolova, 2009).

Chez *M. galloprovincialis* (Romero et al., 2011) et chez *C. gigas* (Terahara and Takahashi, 2008), l'induction de l'apoptose lors de la phagocytose et des expositions aux métaux a été bien documentée.

L'induction de l'apoptose crée un déséquilibre entre le nombre de cellule vivante et les cellules mortes. Ce déséquilibre est heureusement contrôlé par de nombreuses protéines anti-apoptotiques telles que XIAP, IAP, BIR, etc. De nombreux transcrits codant pour XIAP, IAP et BIR ont été identifiés dans le transcriptome de *M. edulis* exposé au Cd. Plus précisément, 116 transcrits ont été identifiés comme étant associés aux BIR (toutes familles confondues), 126 comme étant des IAP (102 étant des inhibiteurs d'apoptose de type 1) et 95 XIAP. XIAP fait partie de la famille des IAP et son induction par les métaux chez les bivalves n'avait pas encore été observé. Il est possible d'envisager que le Cd peut se lier à la protéine et prendre la place du Zn dans le domaine BIR de la protéine. Cette action pourrait modifier l'activité de XIAP. En plus, XIAP est la seule IAP qui puisse directement inhiber la phase d'initiation et d'exécution des caspases lors de l'apoptose (Mufti et al., 2006). L'induction des caspases et de GADD45 est un signe de la mise en place des processus apoptotiques et l'induction de XIAP pourrait justement jouer un rôle dans le contrôle de ce phénomène puisque XIAP est connue pour contrer les effets génotoxiques du Cd. Nous avons d'ailleurs validé l'expression de ces transcrits par RT-PCR dans les hémocytes exposés au Cd (chapitre IV). Nous pensons que ces trois gènes, XIAP, GADD45 et CAS8 pourraient être utilisés comme des marqueurs de toxicité du Cd.

L'autophagie joue un rôle important dans la dégradation des organelles et des protéines non-fonctionnelles et présentes dans les cellules (Glick et al., 2010). Ce processus semble être important car la phagocytose est un modèle basé sur la mesure de l'invagination de particules (billes en latex). L'autophagie pourrait être aussi un processus mis en place par les hémocytes pour éliminer ces particules (ou même autre corps étranger). Comme nous l'avons vu, le Cd peut provoquer de nombreux dommages dans une cellule et modifier son bon fonctionnement. C'est pourquoi nous avons tenté d'identifier les composants du processus d'autophagie (Annexe XIV). Nous avons ainsi pu identifier 23 transcrits codant pour des ATG, 2 pour Beclin-1 et 1 transcrit codant pour une protéine responsable de la régulation de mTOR. Nous avons aussi mis en avant la présence de transcrits codant pour des protéines associées à la modulation de l'autophagie due aux dommages de l'ADN (DRAM1/2). De tous ces transcrits, seul un, ATG (ATG13), a été induit par le Cd. D'autres études seront donc nécessaires pour approfondir nos connaissances sur l'autophagie et sa modulation par le Cd chez les bivalves.

## **7 CORRÉLATION ENTRE LES FONCTIONS HÉMOCYTAIRES ET LES MARQUEURS MOLÉCULAIRES**

En plus d'avoir identifié les transcrits modulés par le Cd, nous avons tenté de relier ces derniers aux réponses fonctionnelles (la phagocytose et la viabilité). Nous avons pu voir dans le chapitre IV que les gènes HSP70, CYP2C8, SOD ainsi que l'expression des gènes codant pour GADD45, XIAP et le TLRs était inversement proportionnelle à la viabilité et la phagocytose. L'induction de HSP70, CYP2C8 et SOD pourrait être sous-jacente à un effet cytotoxique important qui pourrait donc expliquer un mauvais fonctionnement global de la cellule et avoir un impact sur les voies d'activation associées au processus de survie. Le Cd étant génotoxique, peut avoir provoqué des liaisons à l'ADN ce qui aurait pu aussi déclencher une diminution de la phagocytose et activer des processus d'apoptose. Dans le cas de TLR, son induction, comme celle de MYD88 de CAS8, est d'avantage associée à la mise en place du processus apoptotique qu'à celui de la phagocytose (Aliprantis et al., 2000; Iorns et al., 2009; Salaun et al., 2007). En effet, TLR2 et 4 sont connus pour activer MYD88, qui à son tour va recruter FADD afin de promouvoir CAS8 et induire l'apoptose. Nos résultats mettent ainsi clairement en évidence l'importance du processus apoptotique lors de l'exposition au Cd. Cependant, des études plus approfondies doivent être faites afin de bien démêler le rôle du Cd sur la phagocytose, la viabilité cellulaire et l'apoptose.



## **CHAPITRE V**

### **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Le Cd est un métal divalent omniprésent à l'échelle planétaire à des concentrations variables. On le retrouve principalement dans les écosystèmes aquatiques. C'est un élément non-essentiel qui pénètre dans les cellules par les voies calciques étant donné ses caractéristiques physico-chimiques semblables à celles du calcium, élément essentiel pour le bon fonctionnement des cellules. Les moules, un bivalve largement consommé par l'humain et beaucoup utilisé dans les études écotoxicologiques, est soumis à cette contamination. Étant des organismes filtreurs et sédentaires, ils sont soumis aux conditions de leur environnement. C'est d'ailleurs pour ces raisons que la moule est un organisme modèle et sentinelle pour les études sur les impacts des effets sur l'environnement.

Dans notre étude nous avons mis en place un modèle *in vitro*, c'est à dire une exposition des hémocytes hors de l'organisme, pour mettre à l'étude les effets du Cd sur la viabilité et la phagocytose des hémocytes de la moule bleue. Grâce à notre modèle, nous avons pu observer que la phagocytose diminuait d'environ 55% pour la concentration de  $10^{-3}$ M alors que la viabilité restait raisonnable (>60%). Ces résultats illustrent de façon claire la toxicité du Cd sur la principale fonction hémocytaire. Basées sur ces résultats, des analyses transcriptomiques ont été faites afin d'élucider les mécanismes phagocytaires hémocytaires modulés par le Cd. Nous avons porté une attention particulière aux processus moléculaires impliqués dans la phagocytose et dans les défenses immunitaires (ACT, TLRs, NAS13 et TPS5). Nous avons aussi étudié les gènes clés associés au stress cellulaire, notamment ceux codant pour la SOD, HSP70 et la MRP1. Nous avons aussi étudié les gènes impliqués dans la génotoxicité (GADD45, XIAP, CAS8), les voies de signalisation du calcium (CALM) et le métabolisme des xénobiotiques (CYP2C8). Tous ces gènes ont été modulés par le Cd dans les hémocytes exposés au Cd.

D'autre part, notre étude a validé, par deux technologies, que le Cd induit une expression différentielle de gènes qui jouent un rôle clé dans le système immunitaire des hémocytes de *M. edulis*. Globalement, le Cd induit l'expression des gènes HSP70, CYP et SOD, TLR, GADD45 et XIAP. Les niveaux d'expression de ces gènes sont inversement corrélés avec la viabilité et la phagocytose. À noter, l'induction de l'expression du gène GADD45 pourrait être liée à un certain niveau de dommages à l'ADN et donc à l'induction de l'apoptose. En effet, l'induction des TLR, MYD88 et CAS8 sont favorables à la voie moléculaire apoptotique. L'induction TLR2 et 4 entraînerait une activation MYD88 qui recruterait le récepteur FADD (trouvé dans le transcriptome de *M. edulis*) ce qui peut favoriser la caspase 8 conduisant ainsi à l'apoptose.

Notre modèle a donc permis de bien mettre en évidence les effets cytotoxiques du Cd et des voies d'induction de l'apoptose *via* les TLRs. Ces résultats expliqueraient la diminution de la phagocytose et de la viabilité cellulaire observée.

Peut-être faudrait-il exposer les hémocytes à des concentrations de Cd intermédiaires afin de mieux cibler la phagocytose (c'est à dire d'avoir une viabilité cellulaire supérieure à 90% avec une diminution importante de phagocytose) ?

Notre étude est la première étude qui met en avant l'induction des TLRs, de CYP2C8, NAS13, XIAP et TPS-5 par le Cd chez les bivalves. Cependant, nous n'avons pu observer une augmentation de l'expression de gènes associés à l'activation des voies de signalisation du système immunitaire (comme NF- $\kappa$ B, JAK/STAT, etc). C'est probablement la raison qui explique qu'aucun gène codant pour les molécules effectrices (telles que les PAMP, les cytokines, ou le système proPo) n'ait été induit. D'autres études seraient nécessaires non seulement pour mieux comprendre les effets du Cd dans la phagocytose mais surtout pour mieux étudier la modulation des voies de signalisation et des molécules effectrices.

Comme nous avons vu dans notre étude, le Cd ne semble pas avoir eu d'effets sur les transcrits codant pour les principaux gènes clé des voies de signalisation moléculaire. Ceci a pour conséquence l'absence d'induction des molécules effectrices responsables de la destruction et de l'élimination des corps étrangers. Nous suggérons donc de refaire des tests *in vitro* en exposant les hémocytes à la fois au Cd et à une souche bactérienne. Ces tests sont réalisables au laboratoire et sont réalistes (Araya et al., 2009; Tanguy et al., 2013). Dans l'environnement, les moules sont exposées de façon simultanée aux contaminants et aux bactéries. La combinaison des deux permettrait de mettre réellement en évidence les effets du Cd sur les voies des senseurs de pathogènes, l'induction des voies de signalisation et la production des molécules effectrices

Les biomarqueurs mis en avant dans notre étude ont été testés au laboratoire à des concentrations permettant de les identifier. Il est clair que l'expression de ces gènes devra être validée sur des échantillons environnementaux afin de valider leur pertinence. Afin d'approfondir la compréhension de ces marqueurs, nous suggérons de les tester sur des hémocytes provenant de moules récoltées sur des sites de référence et sur des sites exposés aux pressions anthropiques. Il sera également important de porter une attention sur certains gènes dont nous n'avons pu valider l'expression par RT-qPCR. Ces gènes pourraient aussi faire partie de marqueurs caractérisant la contamination au Cd.



Dans notre étude nous n'avons ni mesuré les concentrations dans les solutions d'expositions (l'hémolymphe) ni dans les cellules. Ces mesures seraient un plus pour l'étude car elles apporteraient des données sur la bioconcentration, la biodisponibilité et les affinités entre le Cd et les molécules organiques présentes dans le plasma. Sur les données transcriptomique, l'association de l'expression des gènes serait reliée à des concentrations réelles et non à des concentrations d'exposition.

Actuellement, de nouveaux génomes complets sont séquencés. Parmi eux, un premier brouillon du génome de *Mytilus galloprovincialis*. Il serait intéressant de refaire des analyses bio-informatiques et de reconstruire le transcriptome de *M. edulis* en utilisant ces nouveaux génomes. Peut-être l'assemblage et la reconstruction des transcrits seraient-ils différents de celui présenté dans notre étude?

## RÉFÉRENCES

- Adema, C.M., Hanington, P.C., Lun, C.-M., Rosenberg, G.H., Aragon, A.D., Stout, B.A., Lennard Richard, M.L., Gross, P.S., Loker, E.S., 2010. Differential transcriptomic responses of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* (Digenea, Platyhelminthes). *Mol. Immunol.* 47, 849–860. doi:10.1016/j.molimm.2009.10.019
- Araya, M.T., Siah, A., Mateo, D.R., Markham, F., McKenna, P., Johnson, G.R., Berthe, F.C.J., 2009. Morphological and Molecular Effects of *Vibrio splendidus* on Hemocytes of Softshell Clams, *Mya arenaria*. *J. Shellfish Res.* 28, 751–758. doi:10.2983/035.028.0403
- Bautista-Covarrubias, J.C., Velarde-Montes, G.J., Voltolina, D., García-de la Parra, L.M., Soto-Jiménez, M.F., Frías-Espericueta, M.G., 2014. Humoral and haemocytic responses of *Litopenaeus vannamei* to Cd exposure. *Sci. World J.* 2014.
- Bouchard, N., Pelletier, E., Fournier, M., 1999. Effects of butyltin compounds on phagocytic-activity of hemocytes from 3 marine bivalves. *Environ. Toxicol. Chem.*
- 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. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/S0300-483X(99)00165-1
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002. Bacteria– hemocyte Interactions and Phagocytosis in Marine Bivalves. *Microsc. Res. Tech* 57, 469–476. doi:10.1002/jemt.10100
- Caza, F., Betoulle, S., Auffret, M., Brousseau, P., Fournier, M., St-Pierre, Y., 2015. Comparative analysis of hemocyte properties from *Mytilus edulis desolationis* and *Aulacomya ater* in the Kerguelen Islands. *Mar. Environ. Res.* 110, 174–182. doi:10.1016/j.marenvres.2015.09.003
- Cheikh Yosra, B., Marie-Agnes, T., Benjamin, M., Yoann, G., Damien, R., Foll Frank, L., 2016. First evidence for a *Vibrio* strain pathogenic to *Mytilus edulis* altering hemocyte immune capacities. *Dev. Comp. Immunol.* 57, 107–119. doi:10.1016/j.dci.2015.12.014
- Dieguez-Acuña, F.J., Polk, W.W., Ellis, M.E., Simmonds, P.L., Kushleika, J. V, Woods, J.S., 2004. Nuclear factor  $\kappa$ B activity determines the sensitivity of kidney epithelial cells to apoptosis: implications for mercury-induced renal failure. *Toxicol. Sci.* 82, 114–123.

Einsporn, S., Bressling, J., Koehler, A., 2009. Cellular localization of lead using an antibody-based detection system and enzyme activity changes in the gills and digestive gland of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 402–408.

Ertl, N.G., O'Connor, W.A., Papanicolaou, A., Wiegand, A.N., Elizur, A., 2016. Transcriptome Analysis of the Sydney Rock Oyster, *Saccostrea glomerata*: Insights into Molluscan Immunity. *PLoS One* 11, e0156649.

Evariste, L., Rioult, D., Brousseau, P., Geffard, A., David, E., Auffret, M., Fournier, M., Betoulle, S., 2017. Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 137, 78–85. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.11.027

Fang, Y., Yang, H., Wang, T., Liu, B., Zhao, H., Chen, M., 2010. Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam *Macrta veneriformis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 151, 325–333. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.cbpc.2009.12.005

Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Brousseau, P., 2000. Phagocytosis as a Biomarker of Immunotoxicity in Wildlife Species Exposed to Environmental Xenobiotics. *Am. Zool.* 40, 412–420.

Fournier, M., Pellerin, J., Lebeuf, M., Brousseau, P., Morin, Y., Cyr, D., 2002. Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquat. Toxicol.* doi:10.1016/S0166-445X(01)00240-5

Franchi, N., Ballarin, L., 2013. Influence of cadmium on the morphology and functionality of haemocytes in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 158, 29–35. doi:10.1016/j.cbpc.2013.04.003

Fuente, H.D.E.L.A., Portales-Perez, D., Baranda, L., Diaz-Barriga, F., Saavedra-Alanis, V., Layseca, E., Gonzalez-Amaro, R., 2002. Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.* 129, 69–77. doi:10.1046/j.1365-2249.2002.01885.x

Fujimaki, H., Ishido, M., Nohara, K., 2000. Induction of apoptosis in mouse thymocytes by cadmium. *Toxicol. Lett.* 115, 99–105. doi://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(00)00178-8

Gerdol, M., Venier, P., 2015. An updated molecular basis for mussel immunity. *Fish Shellfish Immunol.* doi://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.013



- Gestal, C., Pallavicini, A., Venier, P., Novoa, B., Figueras, A., 2010. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 926–934. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.dci.2010.02.012
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F., 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221, 3–12. doi:10.1002/path.2697
- Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Bebianno, M.J., 2013. Differential protein expression in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to nano and ionic Ag. *Aquat. Toxicol.* 136, 79–90.
- Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, M. P., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol. Vitro.* 17, 539. doi:10.1016/S0887-2333(03)00093-6
- Granger Joly de Boissel, P., 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 Immunol.* 67, 575–585. doi:10.1016/j.fsi.2017.06.001
- Happonen, K.E., Saxne, T., Aspberg, A., Mörgelin, M., Heinegård, D., Blom, A.M., 2010. Regulation of complement by cartilage oligomeric matrix protein allows for a novel molecular diagnostic principle in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 62, 3574–3583.
- Happonen, K.E., Saxne, T., Geborek, P., Andersson, M., Bengtsson, A.A., Hesselstrand, R., Heinegård, D., Blom, A.M., 2012. Serum COMP-C3b complexes in rheumatic diseases and relation to anti-TNF- $\alpha$  treatment. *Arthritis Res. Ther.* 14, R15.
- Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A.J., Cohen, A.H., Terwilliger, D.P., Buckley, K.M., Brockton, V., Nair, S. V, Berney, K., Fugmann, S.D., Anderson, M.K., Pancer, Z., Cameron, R.A., Smith, L.C., Rast, J.P., 2006. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev. Biol.* 300, 349–365. doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.065
- Hoarau, P., Damiens, G., Roméo, M., Gnassia-Barelli, M., Bebianno, M.J., 2006. Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 143, 196–203. doi://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.02.007
- Huang, X.-D., Liu, W.-G., Guan, Y.-Y., Shi, Y., Wang, Q., Zhao, M., Wu, S.-Z., He, M.-X., 2012. Molecular cloning and characterization of class I NF- $\kappa$ B transcription factor from pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Fish Shellfish Immunol.* 33, 659–666. doi:10.1016/j.fsi.2012.06.029

Ikedioji, C.O., Badisa, V.L., Ayuk-Takem, L.T., Latinwo, L.M., West, J., 2004. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. *Int. J. Mol. Med.* 14, 87–92.

Ivanina, A. V., Hawkins, C., Sokolova, I.M., 2014. Immunomodulation by the interactive effects of cadmium and hypercapnia in marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Fish Shellfish Immunol.* 37, 299–312. doi://dx.doi.org.proxy.library.upei.ca/10.1016/j.fsi.2014.02.016

Jonsson, H., Schiedek, D., Goksøyr, A., Grøsvik, B.E., 2006. Expression of cytoskeletal proteins, cross-reacting with anti-CYP1A, in *Mytilus* sp. exposed to organic contaminants. *Aquat. Toxicol.* 78, S42–S48. doi:10.1016/j.aquatox.2006.02.014

Kiss, T., 2010. Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis* 15, 313–321. doi:10.1007/s10495-009-0446-3

Koutsogiannaki, S., Franzellitti, S., Fabbri, E., Kaloyianni, M., 2014. Oxidative stress parameters induced by exposure to either cadmium or 17 $\beta$ -estradiol on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. The role of signaling molecules. *Aquat. Toxicol.* 146, 186–195. doi://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.005

Kubota, K., Tsuchihashi, Y., Kogure, T., Maeyama, K., Hattori, F., Kinoshita, S., Sakuda, S., Nagasawa, H., Yoshimura, E., Suzuki, M., 2017. Structural and functional analyses of a TIMP and MMP in the ligament of *Pinctada fucata*. *J. Struct. Biol.* doi:10.1016/j.jsb.2017.07.010

Kutikhin, A.G., Yuzhalin, A.E., 2013. The biology of toll-like receptors and NOD-like receptors: the toggles of inflammation, in: *Genomics of Pattern Recognition Receptors*. Springer, pp. 1–25.

Låg, M., Refsnes, M., Lilleaas, E.M., Holme, J.A., Becher, R., Schwarze, P.E., 2005. Role of mitogen activated protein kinases and protein kinase C in cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells. *Toxicology* 211, 253–264. doi:10.1016/j.tox.2005.03.012

Le Moullac, G., Haffner, P., 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191, 121–131. doi:10.1016/S0044-8486(00)00422-1

Li, X., Wang, R., Xun, X., Jiao, W., Zhang, M., Wang, S., Wang, S., Zhang, L., Huang, X., Hu, X., Bao, Z., 2015. The Rho GTPase Family Genes in Bivalvia Genomes: Sequence, Evolution and Expression Analysis. *PLoS One* 10, e0143932. doi:10.1371/journal.pone.0143932 [doi]

Luo, Y.-H., Chang, L.W., Lin, P., 2015. Metal-based nanoparticles and the immune system: activation, inflammation, and potential applications. *Biomed Res. Int.* 2015.

- LyYun, Z., Li, N., Guan, Z., LiXin, X., JianZhong, S., 2013. Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 39–62.
- Mannello, F., Canesi, L., Gazzanelli, G., Gallo, G., 2001. Biochemical properties of metalloproteinases from the hemolymph of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 128, 507–515. doi:S1096495900003523 [pii]
- Marigómez, J.A., Cajaraville, M.P., Angulo, E., 1990. Cellular cadmium distribution in the common winkle, *Littorina littorea* (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochemistry* 94, 191–199. doi:10.1007/BF02440187
- Mason, A.Z., 1983. The uptake, accumulation and excretion of metals by the marine prosobranch gastropod mollusc *Littorina littorea*.
- Mathas, S., Lietz, A., Janz, M., Hinz, M., Jundt, F., Scheidereit, C., Bommert, K., Dörken, B., 2003. Inhibition of NF- $\kappa$ B essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood* 102, 1028–1034.
- Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D.M., Marin, M.G., 2001. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 163–170. doi:10.1007/s002440010234
- McDonagh, B., Tyther, R., Sheehan, D., 2005. Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 73, 315–326. doi:10.1016/j.aquatox.2005.03.020
- Meng, X., Tian, X., Liu, M., Nie, G., Jiang, K., Wang, B., Wang, L., 2014. The transcriptomic response to copper exposure by the gill tissue of Japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) using deep-sequencing technology. *Fish Shellfish Immunol.* 38, 287–293. doi://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.03.009
- Moreira, R., Balseiro, P., Planas, J. V, Fuste, B., Beltran, S., Novoa, B., Figueras, A., 2012. Transcriptomics of in vitro immune-stimulated hemocytes from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing. *PLoS One* 7, e35009. doi:10.1371/journal.pone.0035009
- Moreira, R., Balseiro, P., Romero, A., Dios, S., Posada, D., Novoa, B., Figueras, A., 2012. Gene expression analysis of clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* following bacterial infection yields molecular insights into pathogen resistance and immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 140–149. doi:10.1016/j.dci.2011.06.012



- Mufti, A.R., Burstein, E., Csomos, R.A., Graf, P.C.F., Wilkinson, J.C., Dick, R.D., Challa, M., Son, J.-K., Bratton, S.B., Su, G.L., Brewer, G.J., Jakob, U., Duckett, C.S., 2006. XIAP Is a Copper Binding Protein Deregulated in Wilson's Disease and Other Copper Toxicosis Disorders. *Mol. Cell* 21, 775–785. doi://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.033
- Nayak, R.C., Chang, K.-H., Vaitinadin, N.-S., Cancelas, J.A., 2013. Rho GTPases control specific cytoskeleton-dependent functions of hematopoietic stem cells. *Immunol. Rev.* 256, 10.1111/imr.12119. doi:10.1111/imr.12119
- Nonaka, M., 2011. The complement C3 protein family in invertebrates. *Invertebr. Surviv. J.* 8, 21–32.
- Olabarrieta, I., L'Azou, B., Yuric, S., Cambar, J., Cajaraville, M. P., 2001. In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicol. Vitro.* 15, 511–517. doi://dx.doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00056-X
- Park, J.D., Liu, Y., Klaassen, C.D., 2001. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals<sup>11</sup>Supported by NIH grant ES-01142. *Toxicology* 163, 93–100. doi:10.1016/S0300-483X(01)00375-4
- Peng, T., Wang, W.-N., Gu, M.-M., Xie, C.-Y., Xiao, Y.-C., Liu, Y., Wang, L., 2015. Essential roles of Cdc42 and MAPK in cadmium-induced apoptosis in *Litopenaeus vannamei*. *Aquat. Toxicol.* 163, 89–96. doi://dx.doi.org.proxy.library.uei.ca/10.1016/j.aquatox.2015.03.023
- Philipp, E.E.R., Kraemer, L., Melzner, F., Poustka, A.J., Thieme, S., Findeisen, U., Schreiber, S., Rosenstiel, P., 2012. Massively Parallel RNA Sequencing Identifies a Complex Immune Gene Repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS One* 7, 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0033091
- Prado-Alvarez, M., Gestal, C., Novoa, B., Figueras, A., 2009. Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 72–83. doi:10.1016/j.fsi.2008.03.002
- Pytharopoulou, S., Grintzalis, K., Sazakli, E., Leotsinidis, M., Georgiou, C.D., Kalpaxis, D.L., 2011. Translational responses and oxidative stress of mussels experimentally exposed to Hg, Cu and Cd: One pattern does not fit at all. *Aquat. Toxicol.* 105, 157–165. doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.007

- Qin, C., Huang, W., Zhou, S., Wang, X., Liu, H., Fan, M., Wang, R., Gao, P., Liao, Z., 2014. Characterization of a novel antimicrobial peptide with chitin-binding domain from *Mytilus coruscus*. *Fish Shellfish Immunol.* 41, 362–370. doi:10.1016/j.fsi.2014.09.019
- Riout, D., 2013. Motilité cellulaire et immunocompétence des hémocytes de *Mytilus edulis* - Applications aux diagnostics environnementaux. <http://www.theses.fr>. Le Havre.
- Romero, A., Estévez-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.
- Romero, A., Novoa, B., Figueras, A., 2015. The complexity of apoptotic cell death in mollusks: An update. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 79–87. doi:10.1016/j.fsi.2015.03.038
- 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. doi:10.1016/S0166-445X(01)00232-6
- Schoonbroodt, S., Piette, J., 2000. Oxidative stress interference with the nuclear factor- $\kappa$ B activation pathways. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1075–1083.
- Shumilla, J.A., Broderick, R.J., Wang, Y., Barchowsky, A., 1999. Chromium(VI) inhibits the transcriptional activity of nuclear factor- $\kappa$ B by decreasing the interaction of p65 with cAMP-responsive element-binding protein-binding protein. *J. Biol. Chem.* 274, 36207–12. doi:10.1074/JBC.274.51.36207
- Sokolova, I.M., 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebr. Surviv. J.* 6, 49–58.
- 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. doi:10.1242/jeb.01152
- Soudant, P., Chu E., F.-L., Volety, A., 2013. Host–parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. *J. Invertebr. Pathol.* doi:10.1016/j.jip.2013.06.001
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radical Biology and Medicine.* doi:10.1016/0891-5849(94)00159-H
- Sun, Y.-D., Zhao, X.-F., Kang, C.-J., Wang, J.-X., 2006. Molecular cloning and characterization of Fc-TSP from the Chinese shrimp *Fennerpenaeus chinensis*. *Mol. Immunol.* 43, 1202–1210. doi:10.1016/j.molimm.2005.07.014

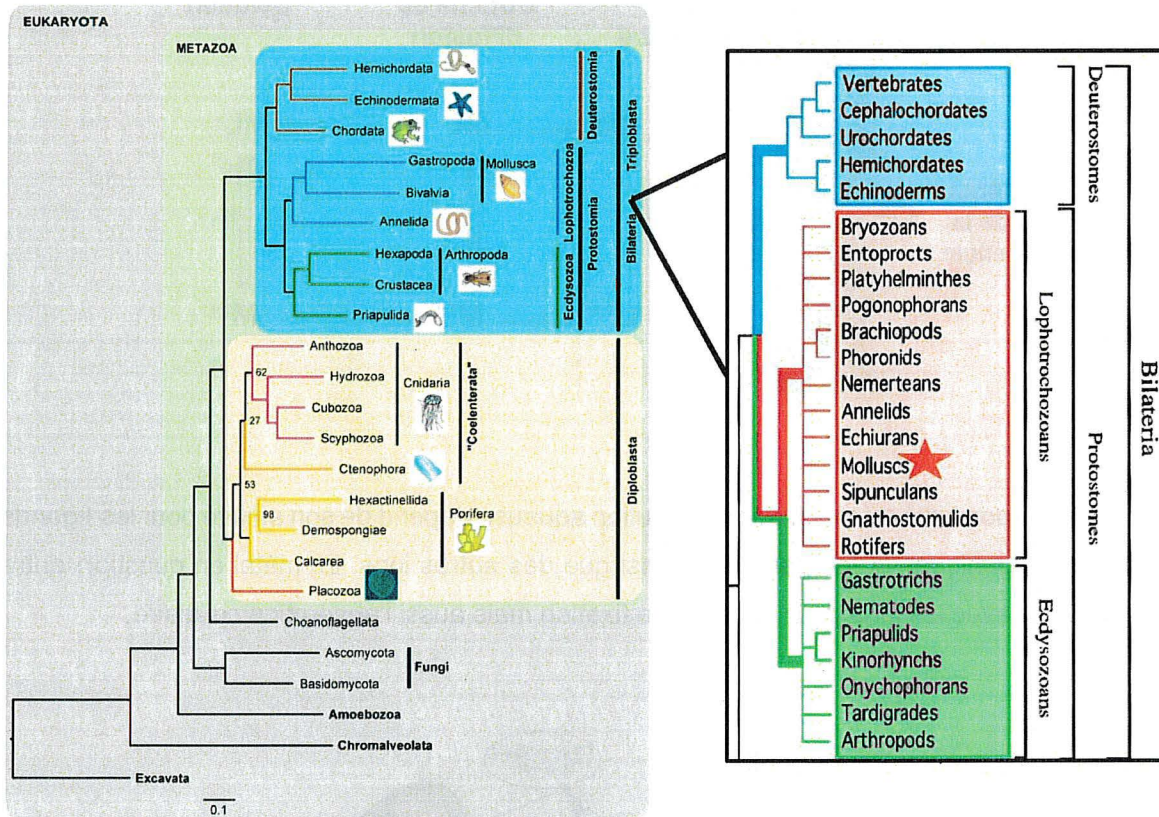
- Takagi, M., Kikko, T., Hosoi, M., Hayashi, I., Toyohara, H., 2004. cDNA cloning of oyster matrix metalloproteinase and its possible involvement in hypoxic adaptation. *Fish. Sci.* 70, 682–687.
- Tan, K., Lawler, J., 2009. The interaction of Thrombospondins with extracellular matrix proteins. *J. Cell Commun. Signal.* 3, 177–187. doi:10.1007/s12079-009-0074-2
- Tanguy, M., McKenna, P., Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Danger, J.-M., Siah, A., 2013. Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 419–429. doi://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2012.10.015
- Terahara, K., Takahashi, K.G., 2008. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. *Curr. Pharm. Des.* 14, 131–137.
- Uzzo, R.G., Leavis, P., Hatch, W., Gabai, V.L., Dulin, N., Zvartau, N., Kolenko, V.M., 2002. Zinc inhibits nuclear factor- $\kappa$ B activation and sensitizes prostate cancer cells to cytotoxic agents. *Clin. Cancer Res.* 8, 3579–3583.
- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., Thiagarajan, R., Thilagam, H., 2009. Immunotoxic effects of nickel in the mud crab *Scylla serrata*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 133–139. doi:10.1016/j.fsi.2008.02.015
- Wei, K., Yang, J., 2016. Copper-induced oxidative damage to the prophenoloxidase-activating system in the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol.* 52, 221–229. doi:10.1016/j.fsi.2016.03.151
- Xiang, Z., Qu, F., Qi, L., Zhang, Y., Tong, Y., Yu, Z., 2013. Cloning, characterization and expression analysis of a caspase-8 like gene from the Hong Kong oyster, *Crassostrea hongkongensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1797–1803. doi://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.08.026
- Xie, J., Shaikh, Z., 2006. Cadmium-induced apoptosis in rat kidney epithelial cells involves decrease in nuclear factor-kappa B activity. *Toxicol. Sci.* 91, 299–308. doi:10.1093/toxsci/kfj131
- Zhang, H., Zhai, Y., Yao, L., Jiang, Y., Li, F., 2016. Discovery of genes associated with cadmium accumulation from gill of scallop *Chlamys farreri* based on high-throughput sequencing. *Genes Genomics* 38, 439–445. doi:10.1007/s13258-016-0391-9
- Zhou, Y., Jing, W., Dahms, H.-U., Hwang, J.-S., Wang, L., 2017. Oxidative damage, ultrastructural alterations and gene expressions of hemocytes in the freshwater crab *Sinopotamon henanense* exposed to cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 138, 130–138. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.12.030



Ziegler, G., Paynter, K., Fisher, D., 2002. Matrix metalloproteinase-like activity from hemocytes of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 131, 361–370. doi://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00518-9

# ANNEXES

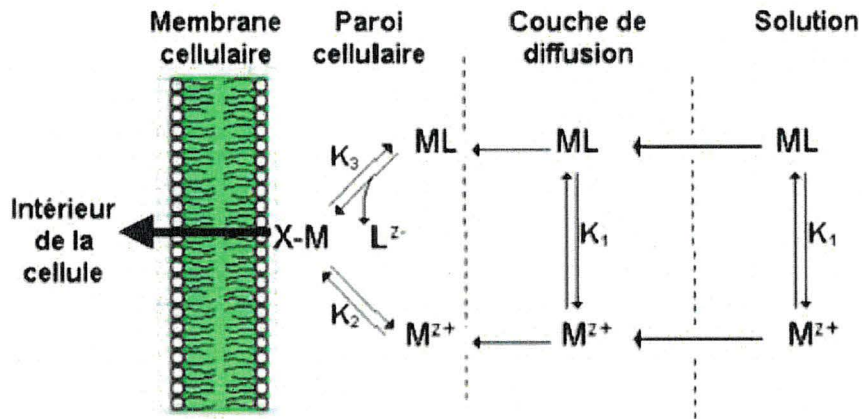
## ANNEXE I: Phylogénie de *M. edulis* (Étoile Rouge)



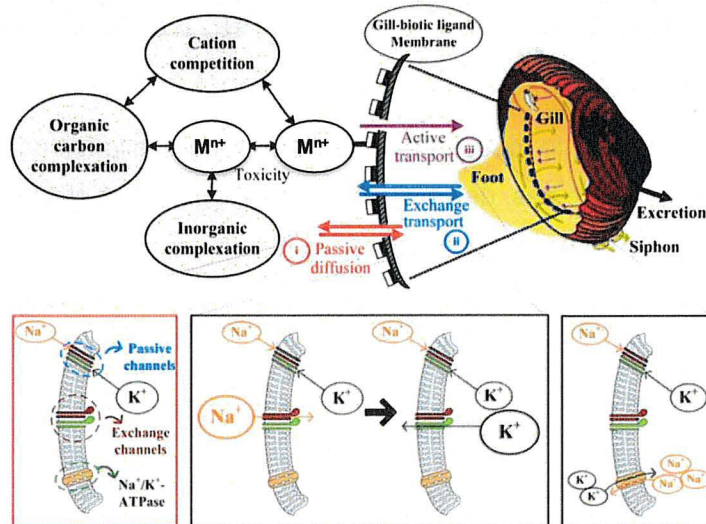
Si l'on retrace la phylogénie de la moule (Figure 1-Étoile rouge), elle fait partie des bivalves, des lophotrochozoans, des protostomes, des bilatéraux, des métazoaires et des eucaryotes.

## ANNEXE II: Modèle de l'Ion Libre (FIAM) et du Ligand Biotique (BLM)

FIAM : La fraction biodisponible est proportionnelle à la concentration extracellulaire ou en solution.



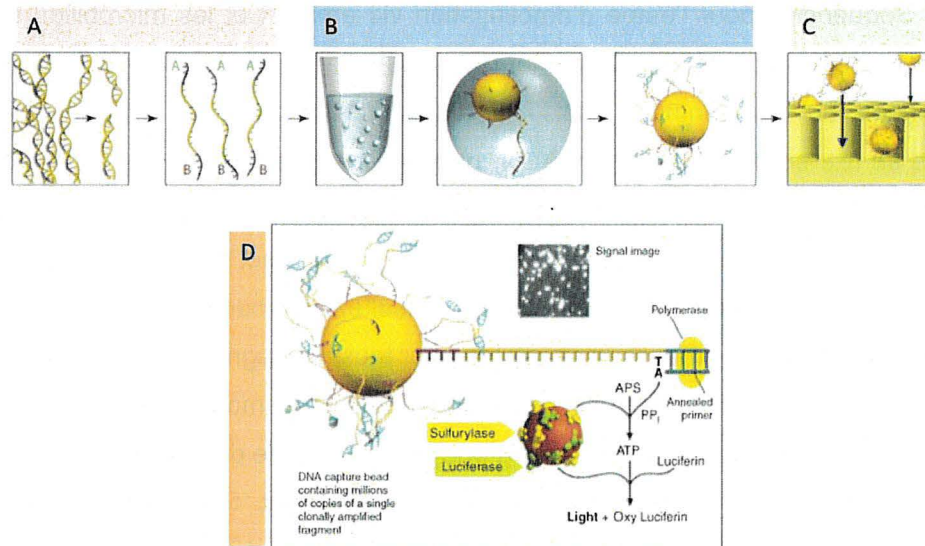
BLM : La biodisponibilité du métal dans la solution aqueuse dépend de son affinité pour les ligands (complexant organiques et inorganiques) ainsi que des autres ions. Le métal en question entre en compétition avec les ions pour les sites de fixation mais aussi l'absorption cellulaire.





## ANNEXE III: Chimie de séquençage de 454 Sequencing (Roche)

Cette technologie est dérivée du pyroséquençage (décrit en 1993 par Nyren et ses collaborateurs) et de la « PCR en émulsion (*emPCR*) » (mise au point par Tawfik et Griffiths en 1993).



**A)** La première étape consiste à fragmenter l'ADN en morceaux de même taille puis à fixer aux extrémités des adaptateurs qui permettent à l'ADN fragmentés de se fixer sur des microsphères. **B)** Un seul brin d'ADN peut se fixer sur une microbille. Les microbilles sont ensuite mises en émulsion en présence des réactifs de *emPCR*. Chaque microbille est enrobée d'une goutte de mélange de réactifs PCR et de solution d'émulsion et l'amplification permet de multiplier chaque fragment sur la microbille. **C)** Les microbilles porteuses d'ADN sont ensuite transférées dans une plaque picotitrée (chaque puits contient une bille) et le pyroséquençage se fait en parallèle. **D)** Le pyroséquençage se fait en présence de l'ADN polymérase, l'ATP sulfurylase, la luciférase et l'apyrase et de substrats. Les fragments d'ADN sont lus grâce à l'ADN polymérase qui incorpore des dNTP un par un (les 4 dNTP ne sont pas présents tous ensemble dans le mélange de séquençage mais incorpore un par un dans le milieu de séquençage, après un lavage du milieu). Lorsque le dNTP est incorporé il libère un « pyrophosphate (*PPi*) ». Le *PPi* est alors transformé par l'« adénosine triphosphate (*ATP*) » sulfurylase en ATP. La luciférase, couplée à l'ATP, est utilisée par la luciférase ce qui crée alors une oxydoluciférase plus un signal lumineux. Le signal lumineux est lu par un capteur qui le transforme en pics sur un pyrogramme. L'apyrase nettoie le milieu en dégradant les dNTP non incorporés et l'ATP en surplus. Ensuite une nouvelle solution de dNTP est incorporée.

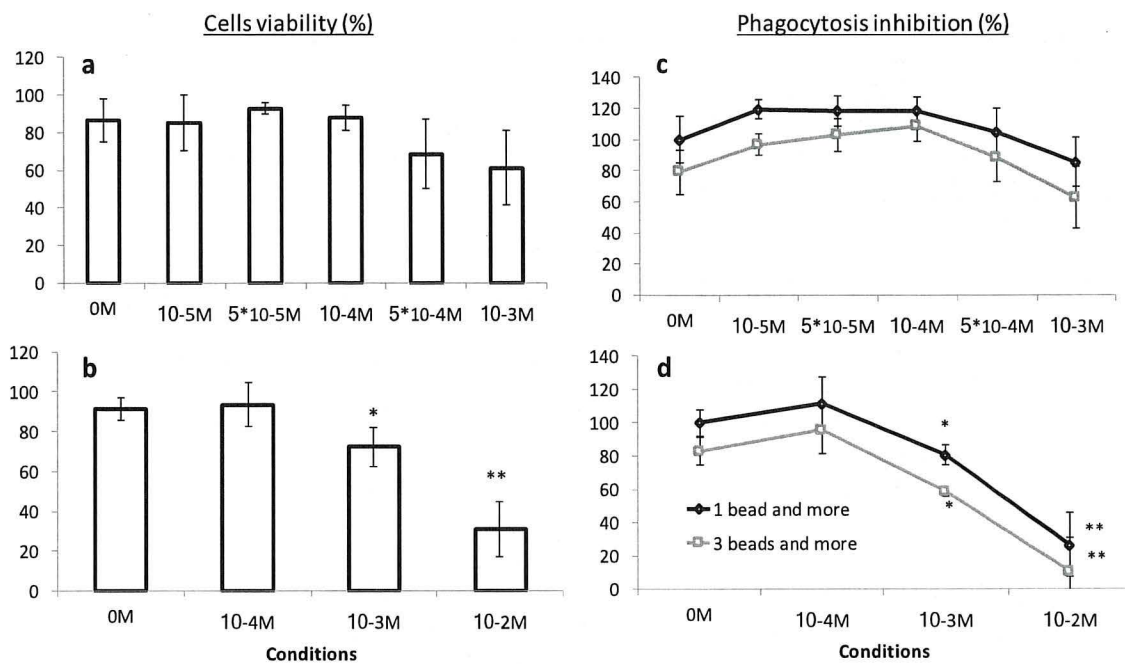
## **ANNEXE IV: Chimie de séquençage de la plateforme SOLiD (Life Technology)**

C'est la troisième plateforme commercialisée. Cette technologie repose sur la même technologie que le 454 Sequencing pour l'étape d'amplification via emPCR et les microbilles sont ensuite déposées sur une surface solide. Cependant le séquençage des fragments ne se fait pas par pyroséquençage ou par synthèse mais par ligation/cleavage. Une amorce universelle de séquençage se fixe sur l'adaptateur et l'ADN, puis des oligonucléotides dégénérés de 8 bases, marqués par un fluorescent, sont ajoutés. Dès que la séquence de 8 oligonucléotides correspond aux bases du fragment d'ADN, une ligase se fixe alors et permet au fluorescent d'émettre une luminosité. Celle-ci est captée par des détecteurs. Ensuite, 6 à 8 bases sont éliminées par clivage par un agent chimique. Ce processus se répète pour tous les fragments. Un fois que celui-ci est entièrement « lu », l'amorce est éliminée et une deuxième amorce universelle se place de nouveau sur le même fragment d'ADN mais à une position initiale de n-1 (une base de moins sur l'adaptateur) et les étapes décrites précédemment se répètent. SOLiD technologie lit chaque fragment d'ADN avec 5 amorces universelles différentes de n-1. Ainsi chaque nucléotide est lu 2 fois ce qui rend cette technique très fiable et exacte. Peu d'erreur de lecture sont commises.

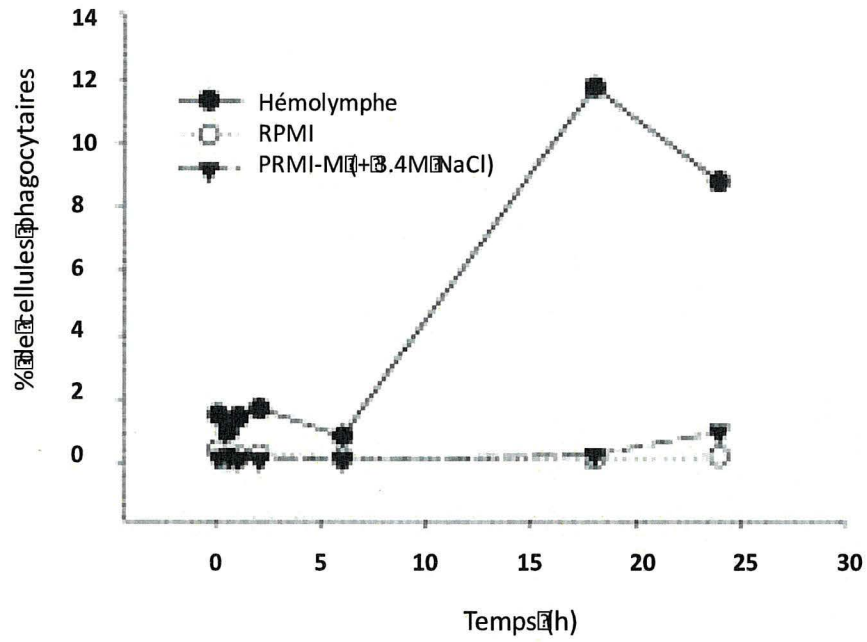




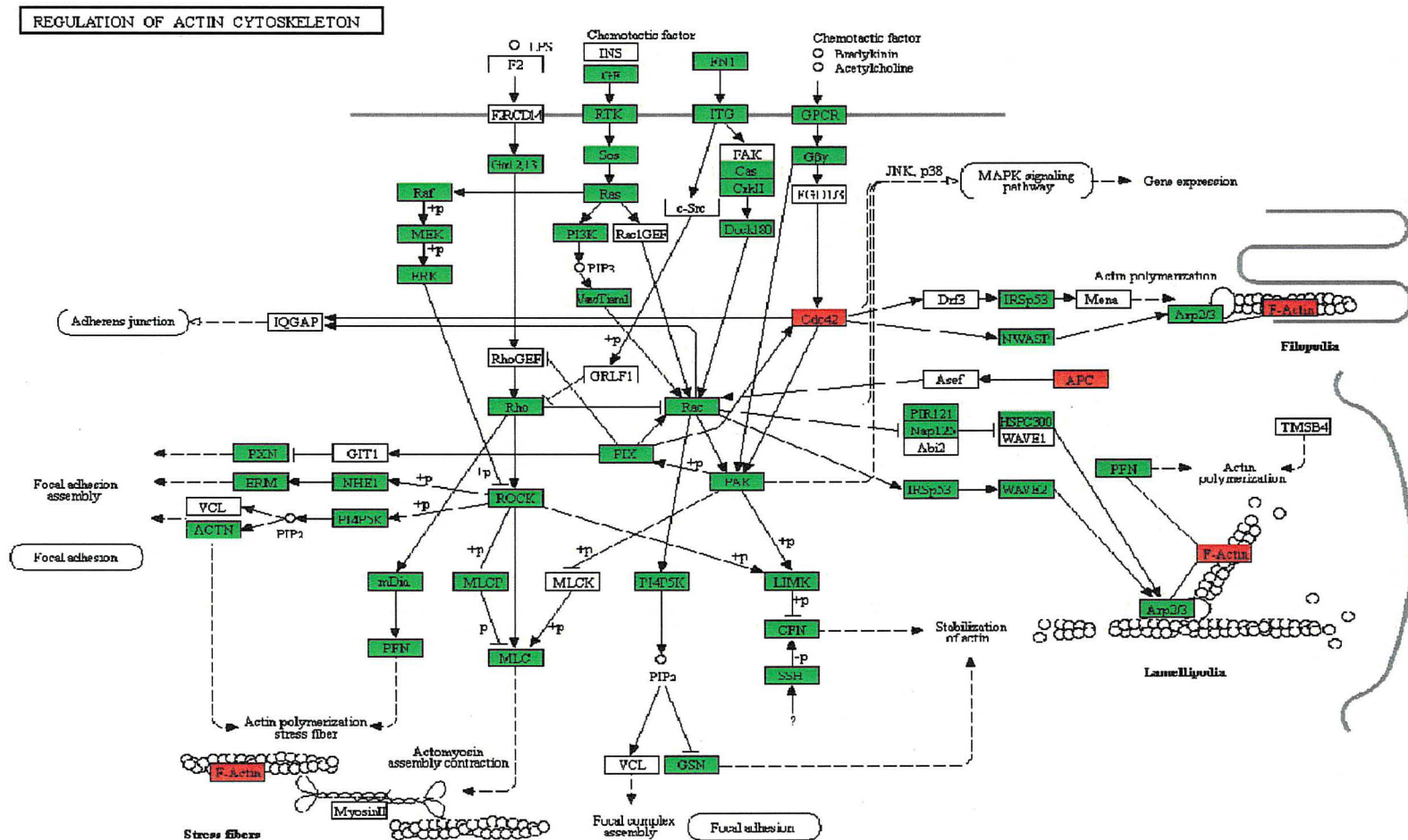
**ANNEXE V: Courbe dose-réponse de la viabilité cellulaire et de la phagocytose des hémocytes de *M. edulis* exposé *in vitro* au cadmium.**



**ANNEXE VI: Cinétique des effets des milieux de culture cellulaires sur les fonctions phagocytaires des hémocytes de *Mye arenaria* (Sauvé et al., 2002).**



## ANNEXE VII: Régulation de l'actine du cytosquelette

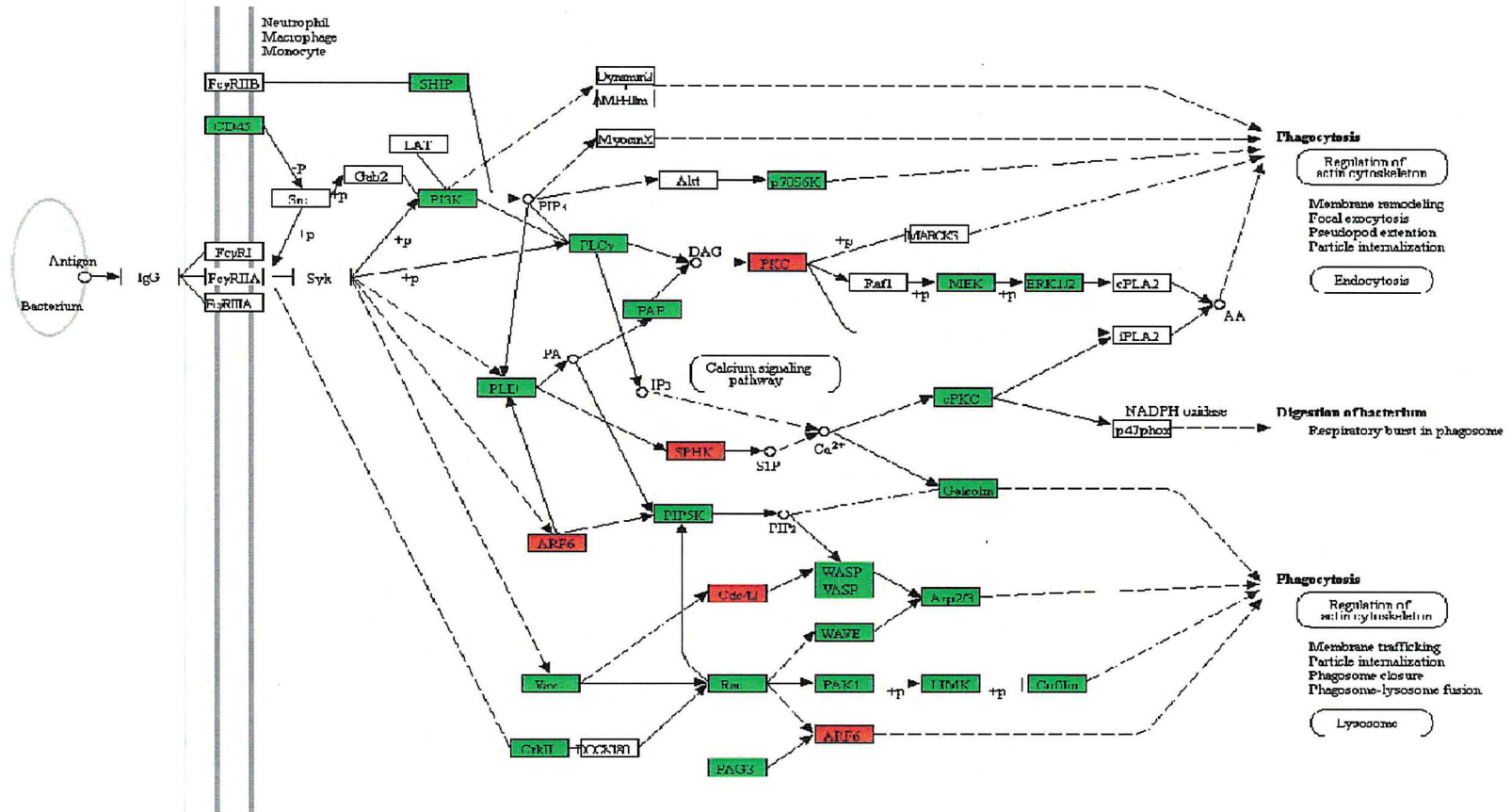


Légende : carré colorés : transcrits identifiés dans le transcriptome de *M. edulis* (rouge : induits par le Cd ; vert : non induits, rose : réprimés par le Cd)



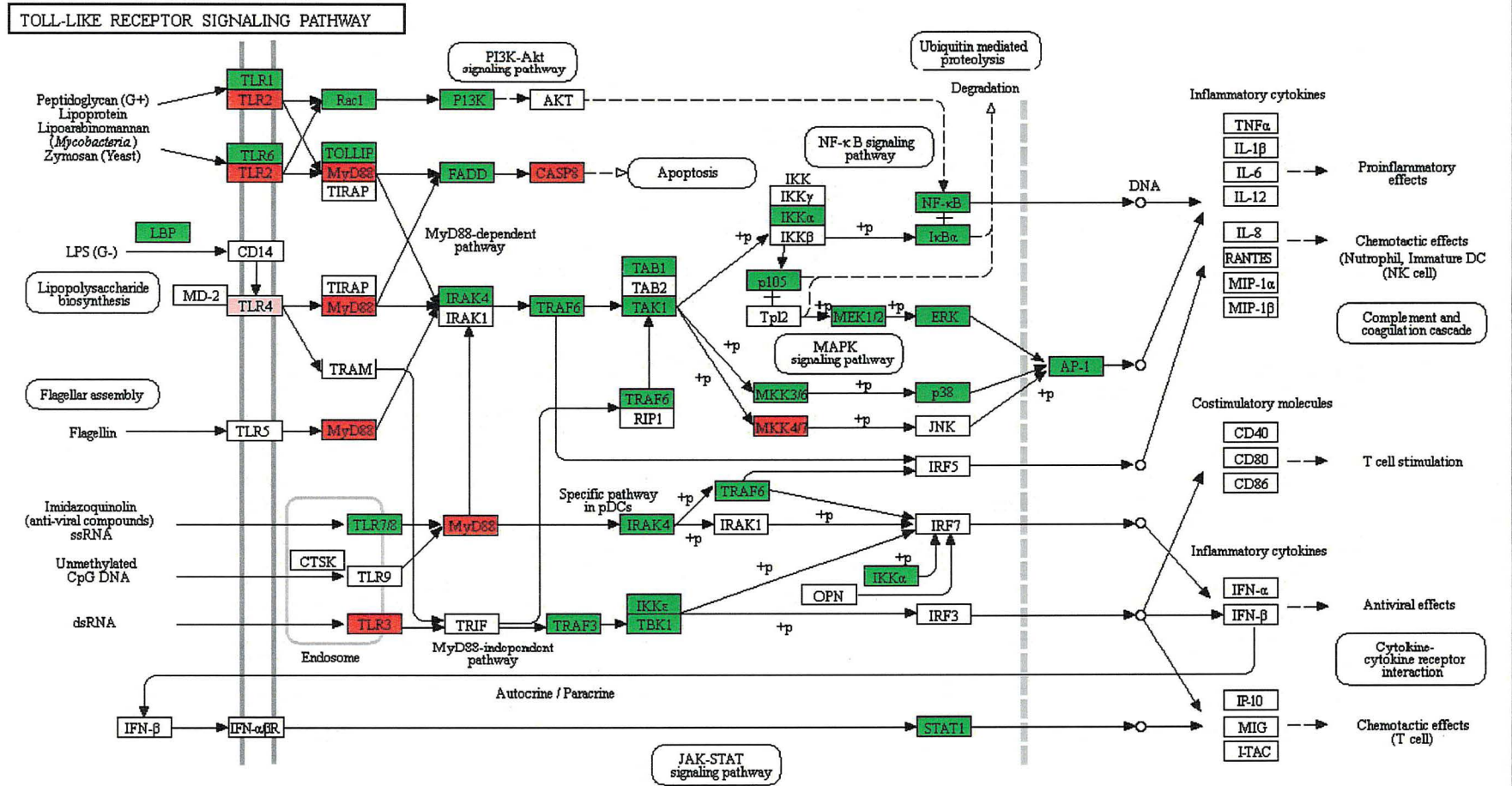
# ANNEXE VIII: Voie de la phagocytose médiée PAR Fc gamma R (FcγR)

FcγR-MEDIATED PHAGOCYTOSIS



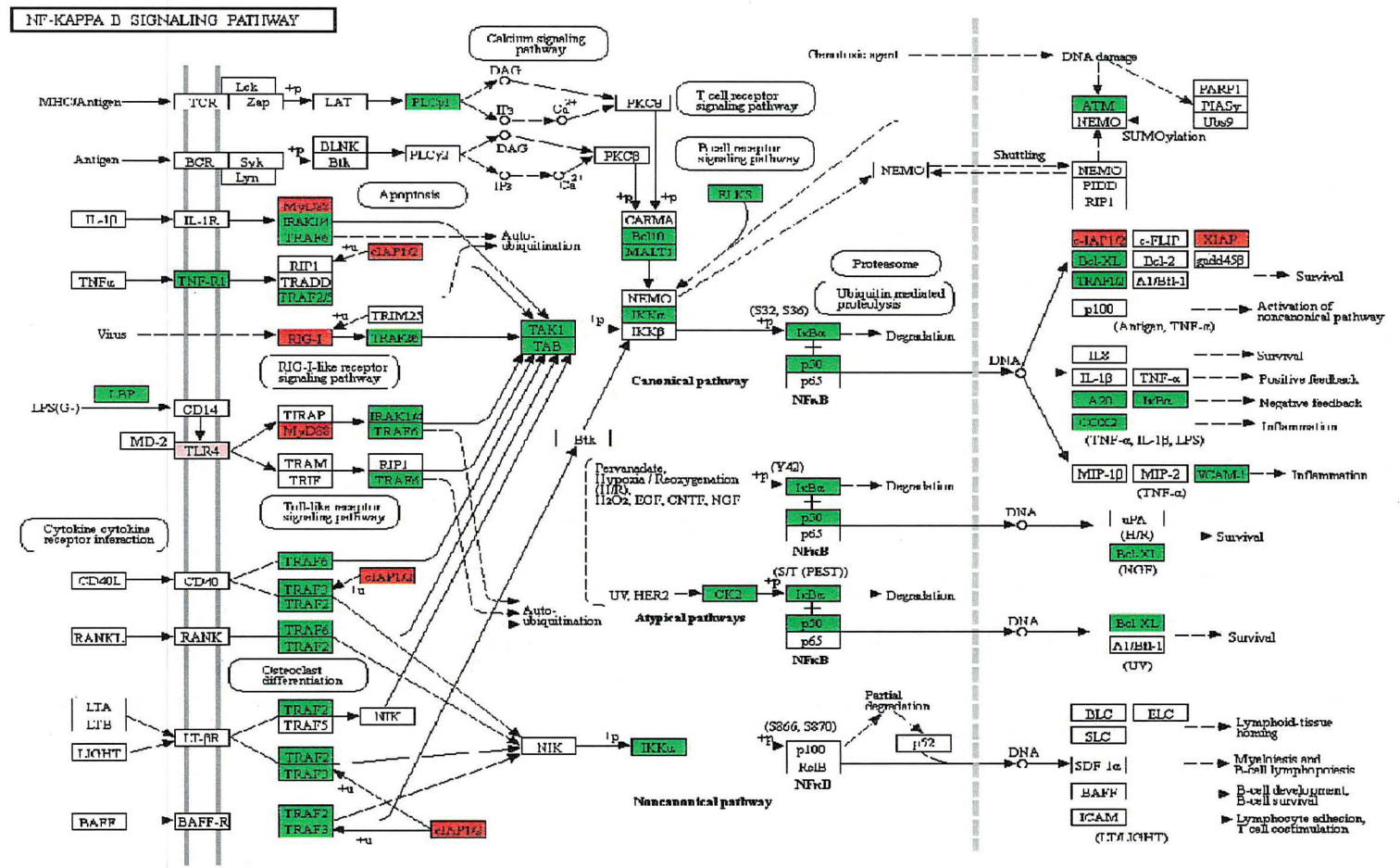
Légende : carré colorés : transcrits identifiés dans le transcriptome de *M. edulis* (rouge : induits par le Cd ; vert : non induits, rose : réprimés par le Cd)

## ANNEXE IX: Voie de signalisation des TLR



Légende : carré colorés : transcrits identifiés dans le transcriptome de *M. edulis* (rouge : induits par le Cd ; vert : non induits, rose : réprimés par le Cd)

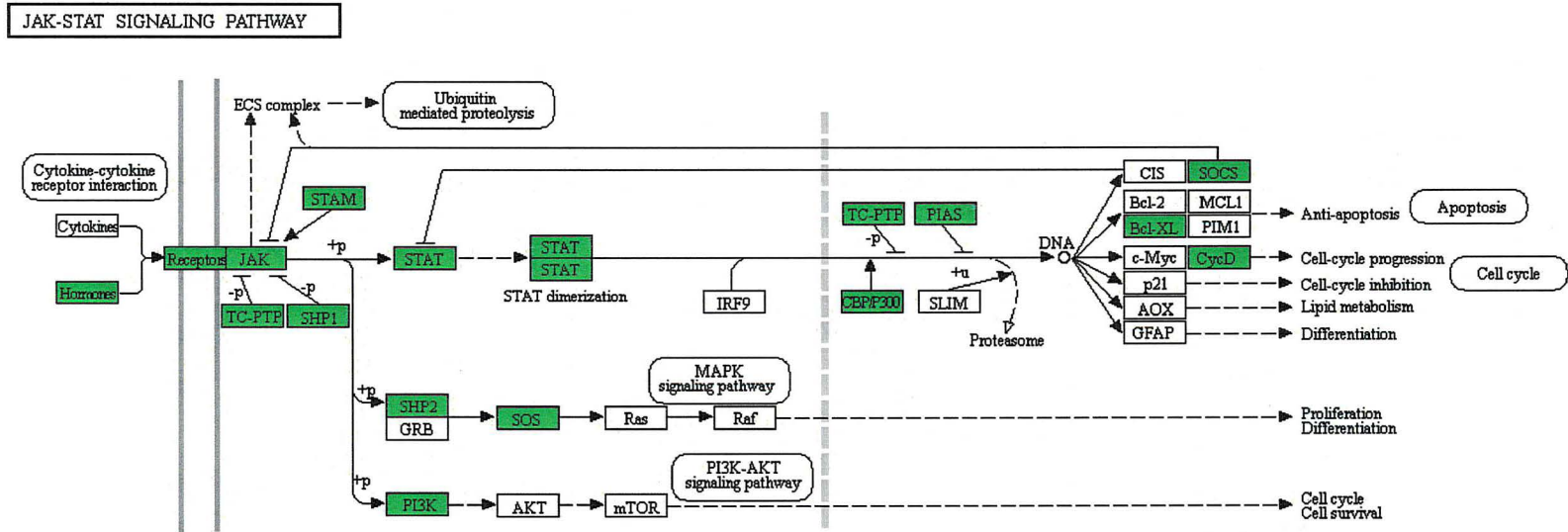
# ANNEXE X: Voie de signalisation NF-kB



Légende : carré colorés : transcrits identifiés dans le transcriptome de *M. edulis* (rouge : induits par le Cd ; vert : non induits, rose : réprimés par le Cd)

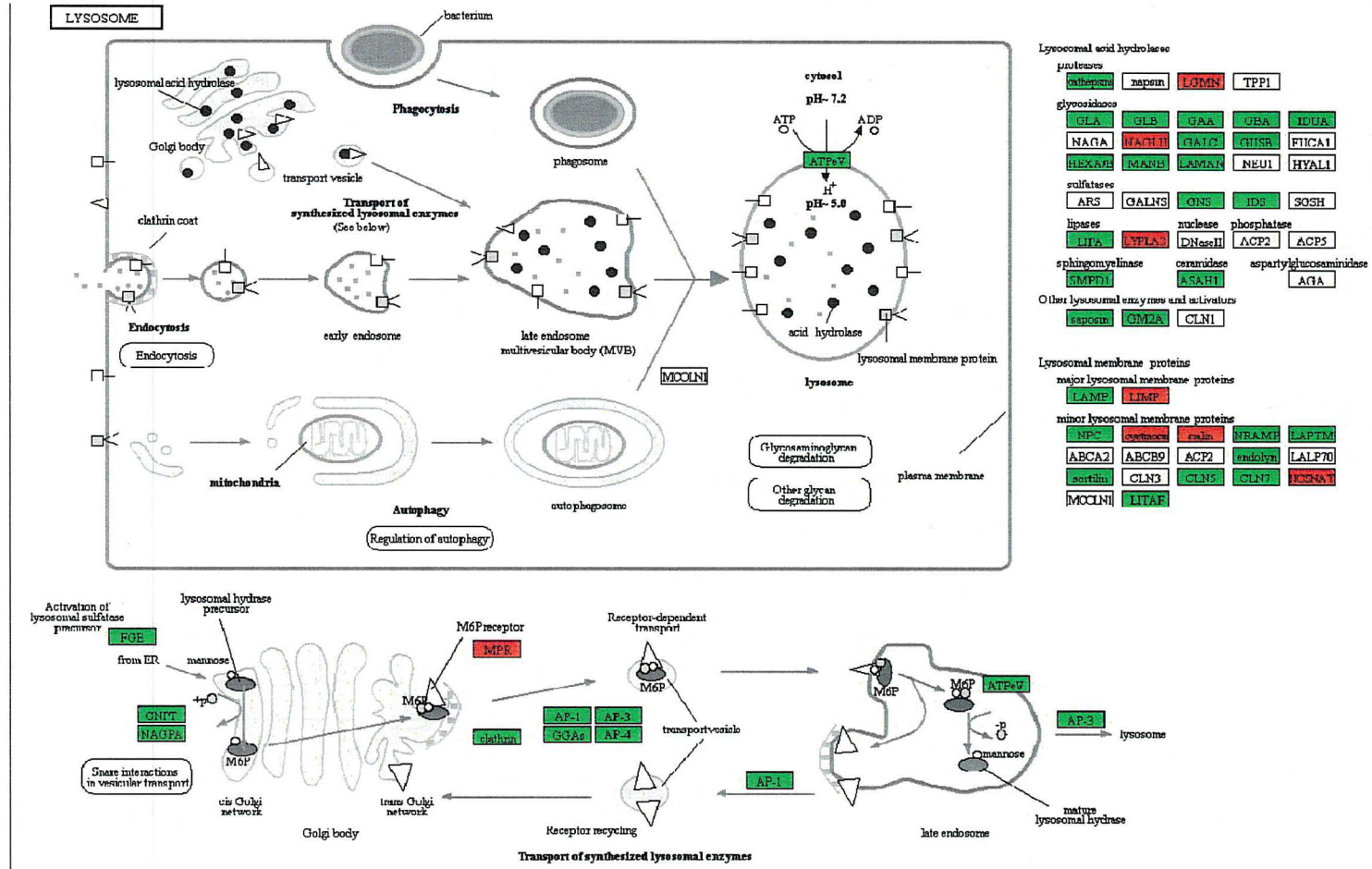


# ANNEXE XI: Voie de signalisation JAK/STAT



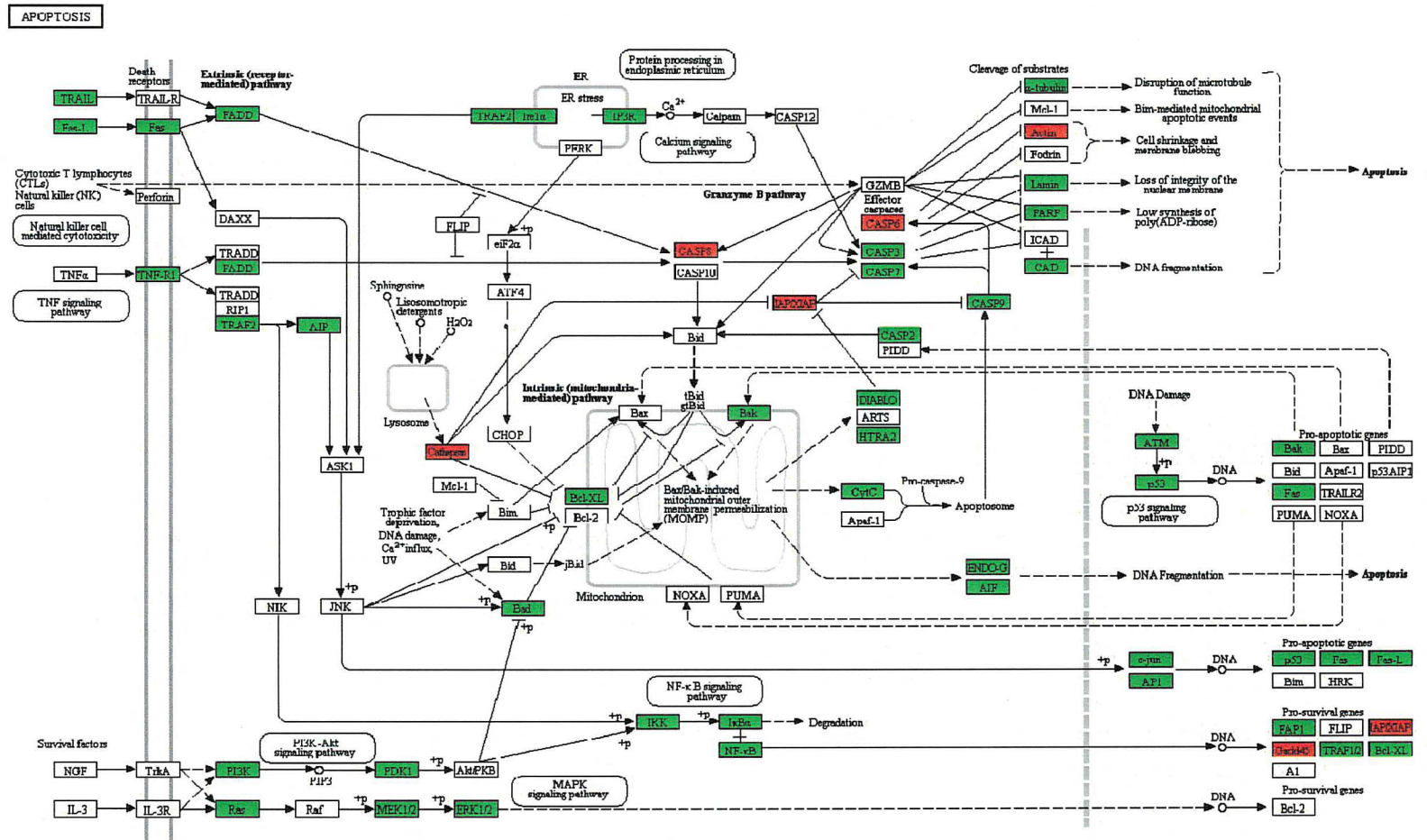
Légende : carré colorés : transcrits identifiés dans le transcriptome de *M. edulis* (rouge : induits par le Cd ; vert : non induits, rose : réprimés par le Cd)

# ANNEXE XII: Lysosome



Légende : carrée colorés : transcrits identifiés dans le transcriptome de *M. edulis* (rouge : induits par le Cd ; vert : non induits, rose : réprimés par le Cd)

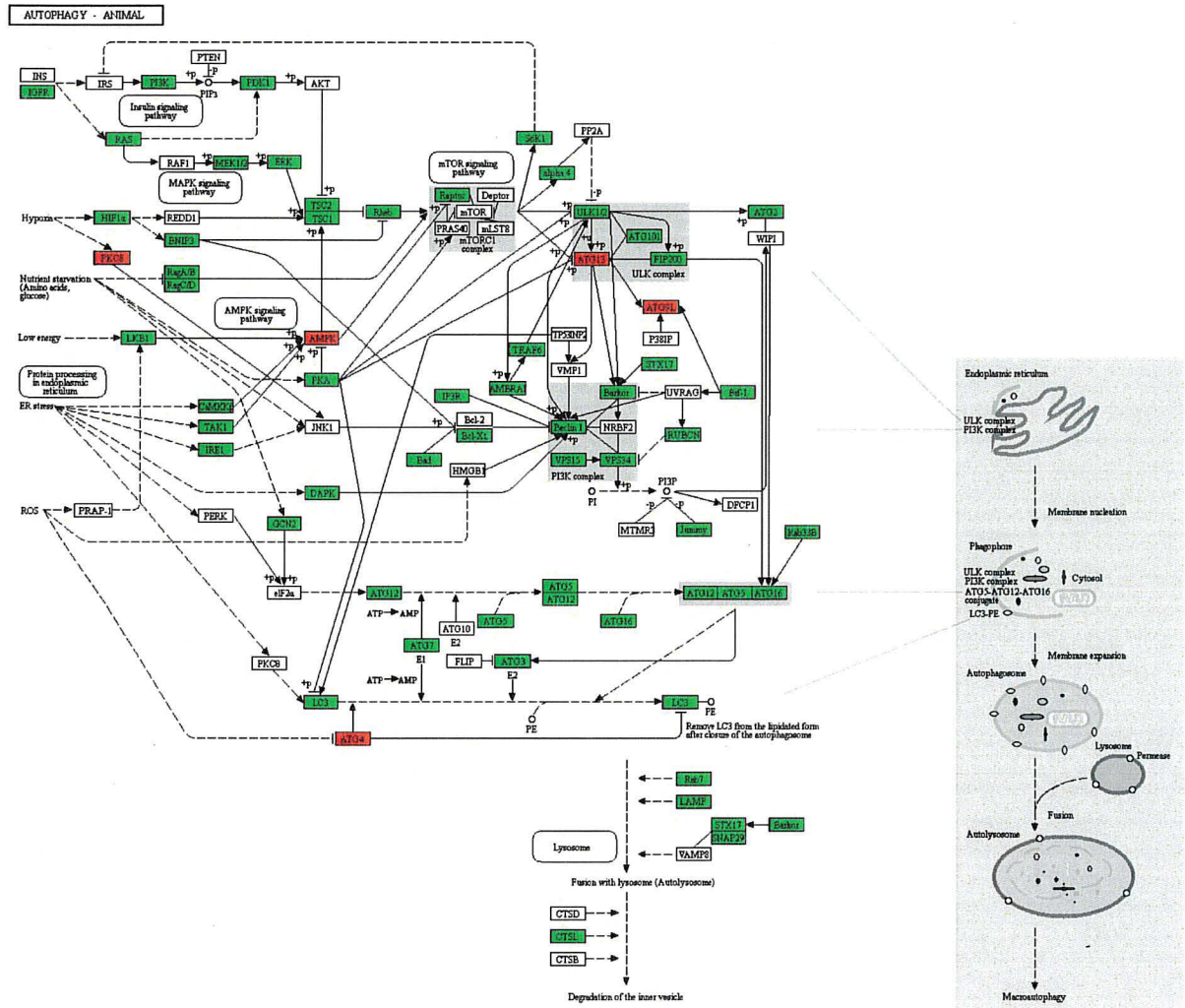
# ANNEXE XIII: Apoptose



Légende : carrée colorés : transcrits identifiés dans le transcriptome de *M. edulis* (rouge : induits par le Cd ; vert : non induits, rose : réprimés par le Cd)



# ANNEXE XIV: Autophagy animal



Légende : carré colorés : transcrits identifiés dans le transcriptome de *M. edulis* (rouge : induits par le Cd ; vert : non induits, rose : réprimés par le Cd)