INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE

INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE–ARDENNE

ECOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE (547)

THESE EN CO-TUTELLE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut national de recherche scientifique – Institut Armand-Frappier

Discipline : Biologie

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline : Physiologie et biologie des organismes - populations - interactions

Spécialité : Ecotoxicologie

Présentée et soutenue publiquement par

Lauris EVARISTE

le 12 juillet 2016

Sous la direction de Mr le Professeur Stéphane BETOULLE, Université de Reims Champagne Ardenne (FRANCE) et de Mr le Professeur Michel FOURNIER, Institut National de Recherche Scientifique (CANADA)

Caractérisations structurale et fonctionnelle des populations hémocytaires de la moule zébrée (*Dreissena* sp.) en vue de leur utilisation en évaluation du risque écotoxicologique.

Jury :

M. Michel Fournier, Professeur, Institut National de la Recherche Scientifique	Examinateur
Mme. Laure Giamberini, Professeur, Université de Lorraine	Rapporteur
M. Bassem Allam, Professeur, Université de Stony Brook	Rapporteur
M. Yves St-Pierre, Professeur, Institut National de la Recherche Scientifique	Examinateur (Président)
M. Alain Geffard, Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne	Examinateur
Mme Béatrice Gagnaire, Chercheur IRSN	Examinatrice
Mme Elise David, Maitre de conférences, Université de Reims Champagne-Ardenne	Invitée
M. Stéphane Betoulle, Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne,	Invité

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier profondément Laure Giamberini et Bassem Allam pour leur expertise scientifique et de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs / examinateurs externes pour ce travail. Un très grand merci également à Béatrice Gagnaire, Yves St-Pierre et Alain Geffard, pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant qu'examinateurs et pour leurs remarques. Je remercie sincèrement Elise David et Stéphane Betoulle pour leur participation à ce jury en tant qu'invités. Un grand merci à l'ensemble du jury pour la qualité des échanges lors de la soutenance.

Je tiens particulièrement à remercier mes directeurs de thèse Michel Fournier, Professeur à l'INRS et Stéphane Betoulle, Professeur à l'Université de Reims, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un tel programme de recherche, pour leur soutien et confiance totale dans la réalisation de ces travaux mais surtout pour leur sympathie. Stéphane merci d'avoir cru en moi pour mener à terme ce projet.

Un merci particulier à Michel Auffret en tant que coordinateur en France pour le projet ANR-CRSNG IPOC. Pour son implication et les échanges au sein de ce programme. Merci également à Michel Fournier, pour la coordination du projet côté québécois.

Un grand merci également à Pauline Brousseau pour son aide lors de mon arrivée au Québec ainsi que pour ses conseils scientifiques et sa gentillesse.

Je suis extrêmement reconnaissant envers Robert Vaillancourt et Jean-Christophe Boussin du Biodôme de Montréal pour leur expertise, leur soutien technique et la grande réactivité dont ils ont fait preuve. Sans leur aide précieuse et leur investissement, les expérimentations *in vivo* n'auraient pas pu avoir lieues.

Un merci particulier à Elise David pour m'avoir appris à être vraiment sûr de ne pas me fier à mes yeux pour ne pas se tromper dans l'identification de mes dreissènes avec

cette belle technique qu'est la RFLP, pour les bons moments passés au labo mais aussi à l'extérieur.

Un grand merci à Jessy Tremblay du Laboratoire de microscopie confocale et cytométrie en flux de l'INRS pour sa sympathie et pour m'avoir permis d'utiliser ce microscope à la pointe de la technologie. Je remercie également Sandra Audonnet du plateau de cytométrie URCACyt pour son aide précieuse avec le tri-cellulaire et sa curiosité pour notre modèle cellulaire si particulier. Merci également à Damien Rioult de la plateforme de cytométrie mobile Mobicyte pour son soutien technique indispensable à la réalisation de ces travaux.

Une pensée particulière pour Marlène Fortier, ton investissement, ta disponibilité et ta bonne humeur, pour les fous rires en dissection (c'est la faute des Br, des G et des mu encore tout ça !). Merci pour tout !

Je tiens également à remercier le professeur Claude Guertin responsable de la formation doctorale à l'INRS pour son aide précieuse et son soutien dans les moments de flous. Un grand merci à Cathy Vaillancourt, Karine Lemarchand, Robert Vaillancourt et Yves St-Pierre d'avoir accepté de faire partie des jurys pour mes enseignements de l'INRS. Un grand merci également à l'administration de l'INRS qui m'a guidé dès mon arrivée à l'institut.

La cotutelle m'a permis de travailler dans deux laboratoires ce qui donne l'opportunité, au-delà de l'aspect scientifique et professionnel, de rencontrer deux fois plus de gens ce qui en fait une aventure humaine incroyablement riche. Je tiens donc à remercier mes collègues Rémois du laboratoire IAE que j'ai intégré en 2013 et qui à mon retour du Canada était devenu l'UMR Sebio. Un grand merci à tous les membres du laboratoire, Isa, Véro, Laurence, Séverine, Fabrice, Marc et Odile pour leur gentillesse et pour faire vivre au quotidien l'équipe. Merci à Emilie pour les goûters à Germaine et la balade en forêt sous ~~une pluie torrentielle~~ un soleil de plomb. Même si tu n'es qu'une enquiquineuse, merci à toi Aurélie pour ta joliesse et ta photocopiogénie (classe non ?). Merci à tata Elise aussi, (c'était un peu trop formel à mon goût ce premier paragraphe

où tu apparais) c'était vraiment super de pouvoir travailler et voyager au Québec avec toi ! Une pensée émue pour feu ta Ka que nous n'oublierons pas.

Un très grand merci à mon papa Alban pour tout ce qu'il a fait pour moi, d'avoir accepté de me recueillir, sale gosse que je suis. Je te remercie aussi pour ce que tu as apporté au quotidien de tous au labo aussi bien par tes compétences scientifiques mais surtout pour tes qualités humaines et ta disponibilité pour les bêtises. Je te souhaite le meilleur pour ton aventure bretonne. Tant que nous sommes en Bretagne, la transition est toute trouvée pour remercier Thomas, notre Pierre Richard malgré lui, dommage qu'on se soit croisés si rapidement, tu as été un très bon gardien de bureau et je te félicite aussi pour avoir accepté de vivre chez « l'ennemi » toi le fier cherbourgeois. J'en profite pour remercier Elodie, la vraie bretonne 100% pur beurre salé, Miss « Kermabrun », fêter tes 29 ans et 12 mois à l'Anse Saint-Jean et voir des baleines avec toi c'était quand même super cool ! Merci aussi pour ta bonne humeur sur le terrain ! Merci à Damien qui était aussi de ce road trip mémorable, merci pour tes bêtises et ton humour (il y en a eu de dites des conneries autour des cytomètres). Ton soutien technique, ton investissement dans les manips et tes compétences indéniables en cytométrie ont été d'une aide précieuse. Il ne faut surtout pas que j'oublie de remercier Gaby, voilà c'est fait… tu es dans mes remerciements même après avoir tué mon poisson rouge… Comme ça tu ne me casseras pas les genoux et je pourrai venir assister à ta soutenance ! Je te souhaite plein de courage pour la fin de ta thèse on pourra fêter ça autour d'une bonne bouteille de lait. Courage aussi aux deux suivants sur la liste pour finir vos thèses, shukraan lak Hakim (oui j'ai pris des cours particuliers d'arabe avec mon ami google) c'était vraiment cool de t'avoir au bureau et je suis désolé que tu te sois étouffé 15 fois par ma faute en buvant. De même pour Alexandra à qui je donne le flambeau du qualificatif de « plus petit », merci à toi, même si tu as choisi délibérément de fuir le meilleur bureau du labo ! Il te reste du temps avant la fin mais tu verras que ça passe très vite ! Un très grand merci à Iris, notre ANOVA à nous, avec sa grande puissance statistique qui m'aura beaucoup appris et aidé à mieux comprendre ce monde étrange, je retiendrai le cultissime Thierry Termite sorti de nulle part (ou peut être de la Margarita ?). J'ai aussi une pensée pour Sabrina et tes insultes bienveillantes au quotidien… pas une journée passée sans méchanceté gratos merci pour ça !

Je remercie aussi mes collègues doctorants devenus grands pendant ma thèse et qui montrent l'exemple, je pense à Virginie, notre belge du sud ou notre sudiste belge on ne sait plus trop, bon courage pour ton tour de monde en pédalo (fais surtout gaffe que Gaby ne te jette pas par-dessus bord). Une pensée pour Mamélie, le gourou des chats qui les guide sur le chemin de la vertu à l'aide de ses GPS (j'ai bien compris ce que tu faisais hein ?). Merci à Laetitia et Ali pour leur gentillesse sans oublier Mélissa qui est passée du bureau des petits à celui des grands grands ! Je te souhaite le meilleur pour ta carrière.

Côté québécois, un immense merci à la « team Fournier », Emilie, le ventre ! Notre maman à tous et sa petite Capu, Julie PEDELUUUUUUUUUUUUUCQ la bruuuuuuute ! Christine notre Deutsche Qualität, Alex le routier en mini, transporteur de moules qui pues et caféinomane de chez Tim Horton, Pierre-Luc le maudit chimiste et sa belle boite à marde c'était fou le terrain merci d'avoir été la ! Messika et Zohra pour votre moral d'acier. Pour tous ces moments passés ensemble que ce soit au labo ou à l'extérieur mais aussi à la cafétéria avec mon bagel spécial aussi (mayo, salade, tomate, jambon, bacon et fromage orange ou blanc selon l'humeur) avec les FRITES et les vendredis gras mais vous me manquez encore plus que toutes ces calories quand même ! C'était une année dingue et intense en plein de choses (surtout en bouffe bouffe), j'ai hâte de pouvoir vous revoir, j'ai envie d'une grosse poutine avec vous et d'une bonne Boréale bien fraîche. Je remercie aussi la poutine qui m'a aidé à survivre au froid. Je pense également aux collègues des labos voisins de l'institut, Marc, Julie, François-René, Florian, Cécile, Marion, Hermance, Etienne, Mathieu, à nos moments de détente ~~qui faisaient oublier les échecs en manip !~~ pour fêter nos réussites en manip !

Un grand merci aussi à Laurie Gemme pour sa gestion sans faille de tout ce qui pouvait survenir sans crier gare.

Cette aventure québécoise a été une aventure humaine très enrichissante qui m'a permis de rencontrer beaucoup de gens biens en dehors du travail et de tous horizons, qui ont rendu cette année passée outre atlantique unique. Je pense en particulier à Mathilde, Alberto, Thibault, Maureen, Elvis, Shugoofta ainsi que mes collocs (et

apparentés) Ainhoa, le petit Oliver, Priscille, Maÿlis, Renault et Angèle. J’ai hâte de vous revoir.

Pour finir, je remercie du fond du cœur mes amis de toujours et ma famille, mes parents et mon frère qui m’ont soutenu et encouragés tout au long de mon parcours et durant ces années de thèse. L’éloignement géographique ou le décalage horaire n’ont en rien affecté le soutien que je pouvais recevoir de votre part. Vous avez toujours eu confiance en ce que je pouvais accomplir et pour ça, je vous remercie infiniment.

Je voulais garder le meilleur pour la fin ou plutôt la meilleure et pour moi le plus important, Aude, ma moitié, mon repère, merci d’avoir été à mes côtés, d’avoir cru en moi, d’avoir fait autant de sacrifices et de m’avoir suivi dans cette aventure. Je te remercie pour ton soutien sans faille durant toutes ces années. Je ne suis pas sûre d’avoir les mots justes pour te remercier à la hauteur de ce que tu m’as apporté et ce que tu m’apportes au quotidien, je t’aime.

Résumé

Caractérisations structurale et fonctionnelle des populations hémocytaires de la moule zébrée (*Dreissena* sp.) en vue de leur utilisation en évaluation du risque écotoxicologique.

L'extension des activités humaines est responsable du rejet de molécules et de perturbations climatiques pouvant affecter la physiologie des organismes aquatiques. La moule zébrée possède des caractéristiques biologiques faisant d'elle une espèce intéressante en surveillance environnementale. Chez cet organisme, les hémocytes constituent une cible privilégiée pour la mise en place d'une approche multi-biomarqueurs. En effet, ces cellules à fonctionnalités multiples sont impliquées dans les grandes fonctions physiologiques de l'espèce et la régulation de l'homéostasie des individus. L'objectif de ce travail est de développer les outils analytiques permettant d'étudier les réponses hémocytaires de la moule zébrée. Les expérimentations menées ont permis de caractériser la structure des populations hémocytaires ainsi que leurs fonctionnalités propres en lien avec le processus de phagocytose. L'utilisation de ces biomarqueurs dans divers contextes indique une forte adaptabilité de l'espèce aux conditions environnementales. Les résultats montrent l'intérêt d'analyser les activités hémocytaires à l'échelle des sous populations comparativement à l'approche globale ne tenant pas compte de la diversité cellulaire. Il a été observé que certains facteurs comme le statut reproducteur ou l'espèce échantillonnée (*D. polymorpha vs D. bugensis*) constituent des facteurs de confusion importants. Il ressort également un positionnement fort du test de phagocytose en tant que marqueur de sensibilité aux contaminants. Ce travail constitue un ensemble de données voué à être utilisé dans des contextes multiples aussi bien en écotoxicologie qu'en écophysiologie.

Mots clefs : Moule zébrée, hémocytes, phagocytose, biomarqueurs, écotoxicologie

Abstract

Structural and functional characterization of hemocyte populations of zebra mussels (*Dreissena* sp.) for use in ecotoxicological risk assessment.

Extension of human activities is responsible of molecule releases and climate changes that may affect physiology of aquatic organisms. The zebra mussel has biological traits making it an interesting species for environmental monitoring. In this organism, hemocyte cells constitute an interesting target to develop a multi-biomarker approach. These cells possess multiple functionalities and are involved in all major physiological functions of the species and in homeostasis regulation. The objective of this work was to develop analytical tools to study hemocyte responses of zebra mussels. Experiments allowed characterizing structure of hemocyte populations and their functionalities linked with phagocytosis process. Use of these biomarkers in various contexts indicated an important adaptation capacity of the species to environmental conditions. Results highlighted interest to analyze hemocyte activities at sub-population scale comparatively to global approach that does not consider hemocyte diversity. It was demonstrated that parameters such as reproductive status or sampled species (*D. polymorpha vs D. bugensis*) constitute important confounding factors. Studies also demonstrated a strong positioning of phagocytosis assay as a sensitive marker to contaminants. This work constitutes a data set destined to be used in multiple contexts such as ecotoxicology or ecophysiology.

Keywords: Zebra mussel, hemocytes, phagocytosis, biomarkers, ecotoxicology

Sommaire

Introduction générale 29

Chapitre 1 : Contexte bibliographique 39

I. Le modèle biologique : Dreissena polymorpha (Pallas 1771) 40

I.1. Taxonomie 40

I.2. Cycle de vie de la dreissène 40

I.3. Ecologie de la dreissène 42

I.4. Besoins environnementaux 45

I.5. Anatomie de l'espèce 46

II. Les hémocytes : cellules clefs dans la physiologie des bivalves 47

II.1. Les différents types hémocytaires : diversité observable 48

II.2. Origines des cellules hémocytaires 52

II.3. Réparation des blessures et de la coquille 55

II.4. Digestion et transport des nutriments 56

II.5. Implications dans la détoxication 56

II.6. Mécanismes de défense chez les bivalves 59

II.7. Mécanismes à médiation humorale 60

II.8. Mécanismes de « défenses » cellulaires 61

III. Facteurs influençant les fonctions hémocytaires chez les bivalves 67

III.1. Les agents infectieux 67

III.2. Température et pH 69

III.3. Variations saisonnières 71

III.4. La pollution chimique 72

IV. Intérêts du modèle expérimental (la moule et ses hémocytes) pour une utilisation en surveillance environnementale 73

IV.1. Intérêt de l'organisme 73

IV.2 L'hémocyte de la dreissène comme support d'une approche multimarqueurs en écotoxicologie 74

Chapitre 2: Bases méthodologiques 75

I. La cytométrie en flux 77

I.1. Rappels historiques 77

I.2. Le système de fluidique 79

I.3. Le système optique 81

I.4. Du signal à l'information 84

I.5. Tri cellulaire 85

I.6. Avantages et limites de la technique de cytométrie en flux 86

II. Développement méthodologique 86

II.1. Prélèvements d'hémolymphe 87

II.2. Choix du milieu de maintien des hémocytes 88

II.3. Limiter l'agrégation cellulaire 89

II.4. Mesure de mortalité cellulaire 91

II.5. Mesure de l'activité de phagocytose hémocytaire 95

II.6. Mesure de l'activité oxydative hémocytaire 103

II.7. Mesure du contenu en lysosomes 106

II.8. Mesure de l'activité mitochondriale 109

III. Discussion 111

Chapitre 3: Caractérisation des populations hémocytaires et leurs fonctionnalités : modulations induites par la ponte 113

Article 1: Functional features of hemocyte subpopulations of the invasive mollusk species *Dreissena polymorpha.* 117

I. Introduction 118

II. Materials and methods 120

II.1. Animals and hemolymph collection 120

II.2. Morphometric characterization of hemocyte subpopulations 121

II.3. Functional characterization of hemocytes subpopulations 122

II.4. Statistical analysis 124

III. Results 124

III.1. Morphometric characterization of hemocytes 124

III.2. Functional characterization of hemocytes subpopulations 127

IV. Discussion 132

Chapitre 4: Approches expérimentales en laboratoire 139

Partie 1 : Approche *ex vivo* : effets du cadmium sur les paramètres fonctionnels hémocytaires chez la dreissène 141

Article 2: Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *Dreissena polymorpha* 144

I. Introduction 145

II. Materials and Methods 147

II.1. Animals and hemolymph collection 147

II.2. *Ex vivo* exposure of hemocytes to cadmium 147

II.3. Hemocyte viability and phagocytosis 148

II.4. Basal oxidative activity 149

II.5. Lysosomal content 149

II.6. Mitochondrial activity 150

II.7. Statistical analysis 150

III. Results 151
III.1. Effects of cadmium on hemocyte viability 151
III.2. Effects of cadmium on phagocytosis parameters 152
III.3. Effects of cadmium on basal oxidative activity 152
III.4. Effects of cadmium on hemocyte lysosomal content 154
III.5. Effects of cadmium on mitochondrial activity 155
IV. Discussion 155
V. Conclusion 160
Partie 2 : Expérimentations en milieu contrôlé : effets de la température et du pH sur les paramètres hémocytaires et influence sur la résistance au cadmium 161
I. Introduction 161
II. Matériels et méthodes 164
II.1. Prélèvements des moules 164
II.2. Système et conditions expérimentales 165
II.3. Prélèvements d'hémolymphe et paramètres structuraux 167
II.4. Analyse des marqueurs hémocytaires 168
II.5. Expositions *ex vivo* des hémocytes au cadmium 169
II.6. Statistiques 170
III. Résultats : Stress thermique et réponses hémocytaires 170
III.1. Paramètres hémocytaires structuraux 170
III.2. Paramètres fonctionnels hémocytaires 173
III.3. Sensibilité du mécanisme de phagocytose au cadmium 176
IV. Résultats : Stress de pH 178
IV.1. Paramètres hémocytaires structuraux 178
IV.2. Paramètres fonctionnels hémocytaires 180

IV.3. Sensibilité du mécanisme de phagocytose au cadmium 183

V. Discussion 183

IV.1. Effets sur les paramètres structuraux 184

V.2. Effets sur les paramètres fonctionnels..... 186

V.3. Effets de la température et du pH sur la sensibilité au cadmium 191

V.4. Tolérances et limites face aux changements environnementaux chez la dreissène 192

VI. Conclusions 194

Chapitre 5: Approches *in situ* sur une large échelle spatiale 197

Partie 1 : Variations temporelles et spatiales des réponses hémocytaires chez des populations de moules zébrées issues de sites différentiellement contaminés ... 200

I. Introduction 200

II. Matériels et Méthodes 203

II.1. Site d'étude en France 203

II.2. Sites d'étude au Québec..... 205

II.3. Analyses chimiques 207

II.4. Analyse des marqueurs hémocytaires 208

II.5. Statistiques 208

III. Résultats : Saisonnalité des réponses des biomarqueurs hémocytaires dans un contexte de pluri-contamination métallique (Bassin de la Seine) 209

III.1. Bioaccumulation des métaux 209

III.2. Marqueurs hémocytaires structuraux et fonctionnels..... 209

IV. Réponses des biomarqueurs hémocytaires dans un contexte de gradient de pluri-contamination (fleuve du Saint-Laurent) 213

IV.1. Bioaccumulation en PCB, HAP et PBDE 213

IV.2. Marqueurs hémocytaires structuraux 214

IV.3. Paramètres hémocytaires fonctionnels 215
IV.4. Sensibilité des hémocytes au cadmium 216
IV.5. Analyses multivariées 218
V. Discussion 219
V.1. Rôle possible du statut reproducteur 221
V.2. Effets de la contamination chimique 223
VI. Conclusion 224
Partie 2 : Comparaison des réponses hémocytaires chez *Dreissena polymoropha* et *Dreissena rostriformis bugensis* 226
I. Introduction 226
II. Matériels et méthodes 230
II.1. Analyse de la contamination des moules par les HAP, PCB et PBDE .. 230
II.2. Prélèvement des moules, analyse des marqueurs hémocytaires 230
II.3. Identification des espèces 231
II.4. Statistiques 233
III. Résultats 233
III.1. Bioaccumulation en PCB, HAP et PBDE 233
III.2. Identification de l'espèce 234
III.3. Comparaison des paramètres structuraux hémocytaires 236
III.4. Comparaison des paramètres fonctionnels hémocytaires 238
III.5. Comparaison de la sensibilité hémocytaire au cadmium 240
IV. Discussion 240
V. Conclusion 244
Chapitre 6 : Synthèse générale et perspectives 245
I. Synthèse générale 246

II. Perspectives 252

Références bibliographiques 255

Annexes..... 291

Liste des figures

Figure 1 : Relation entre pertinence écologique et temps de réponse des différents niveaux d'organisation utilisés en biosurveillance. 32

Figure 2: Schéma de réponse des organismes aux effets néfastes engendrés par l'exposition à un polluant. 33

Figure 3 : Représentation des différents niveaux d'organisation étudiés dans ces travaux de thèse ainsi que leurs intérêts écologiques et mécanistiques. 37

Figure 1. 1 : Taxonomie détaillée de *Dreissena polymorpha* d'après l'ITIS : Integrated Taxonomic Information System (2014). 40

Figure 1. 2 : Schéma du cycle de vie de la moule zébrée, *Dreissena polymorpha*.. 42

Figure 1. 3 : Carte exposant la propagation de la moule zébrée, *Dreissena polymorpha*, en Europe et en Amérique du Nord.. 43

Figure 1. 4 : Schéma des impacts observés (flèches pleines) ou potentiels (flèches pointillées) de la moule zébrée sur les écosystèmes en Europe et Amérique du Nord.44

Figure 1. 5 : Anatomie externe et interne de la dreissène..... 47

Figure 1. 6 : Représentation de la diversité des types hémocytaires observés chez plusieurs classes de mollusques au travers d'études en cytométrie de flux et cytologie. 49

Figure 1. 7 : Illustration de la diversité de distribution des populations hémocytaires en cytométrie de flux chez différentes classes de mollusques. 51

Figure 1. 8 : Représentation des différents états des tubules digestifs chez la dreissène et leur implication potentielle dans l'hématopoïèse 52

Figure 1. 9 : Modèle général d'ontogenèse chez les mollusques bivalves proposé par Mix (1976)..... 53

Figure 1. 10 : Modèle général d'ontogenèse chez les mollusques bivalves proposé par Cheng (1981)..... 54

Figure 1. 11 : Modèle général d'ontogenèse chez les mollusques bivalves proposé par Rebelo *et al.*, 2013. 55

Figure 1. 12 : Schéma synthétique des mécanismes de détoxication cellulaire de phase I, II et III pouvant être induits en réponse à un xénobiotique. 58
Figure 1. 13 : Observation histologique d'une infection par le parasite *Perkinsus* sp. chez *Ruditapes philippinarum* montrant une infiltration massive d'hémocytes dans les tissus du manteau. 62
Figure 1. 14 : Présentation des mécanismes humoraux et cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire innée chez les bivalves. 64
Figure 1. 15 : Processus d'élimination des particules étrangères par les hémocytes phagocytaires. 65
Figure 1. 16 : Effets des contaminants présents dans les écosystèmes aquatiques sur le système immunitaire des mollusques 72

Figure 2. 1 : « Flow cell » où l'échantillon contenant la suspension cellulaire est injecté via le liquide de gaine. 79
Figure 2. 2 : Représentation schématique d'un système fluidique d'un cytomètre en flux dont les fluides sont entraînés sous pression (cas du FACScalibur™). 80
Figure 2. 3 : Principe de diffraction de la lumière émise (autofluorescence) permettant la mesure de la taille et de la complexité cellulaire en cytométrie en flux..... 82
Figure 2. 4 : Bancs optiques des cytomètres Becton Dickinson FACScalibur. 83
Figure 2. 5 : Banc optique du cytomètre Becton Dickinson C6 Accuri™. 83
Figure 2.6 : Principe du tri cellulaire en cytométrie de flux. 85
Figure 2. 7 : Prélèvement d'hémolymphe réalisé chez la dreissène. 87
Figure 2. 8 : Agrégation hémocytaire spontanée observée chez la dreissène. 90
Figure 2. 9 : Evolution des nuages de points représentant les populations hémocytaires chez la dreissène après 10 minutes d'incubation sur glace ou à température ambiante. 91
Figure 2. 10 : Optimisation du protocole de marquage à l'iodure de propidium des cellules hémocytaires mortes chez la moule zébrée. 92
Figure 2. 11 : Histogramme de fluorescence pour la mesure du taux de cellules phagocytaires 96

Figure 2. 12 : Optimisation du protocole de mesure de l'activité de phagocytose des hémocytes chez la moule zébrée. 98
Figure 2. 13 : Observation en microscopie confocale d'hémocytes après 18 heures d'incubation avec des billes fluorescentes. 99
Figure 2. 14 : Mesure de l'inhibition de la phagocytose après 18 heures d'incubation des hémocytes à 4°C, en présence de cytochalasine b à 16°C ou 4°C. 102
Figure 2. 15 : Optimisation du protocole de mesure de l'activité oxydative dans les hémocytes de dreissène. 104
Figure 2. 16 : A : Mesure des effets de l'incubation des hémocytes avec du PMA sur l'activité oxydative par marquage au DCF en cytométrie de flux (BD FACScalibur)..106
Figure 2. 17 : Optimisation du protocole de mesure du contenu en lysosomes avec la sonde Lysotracker Red DND-99.. 107
Figure 2. 18 : Mise au point du protocole de mesure de l'activité mitochondriale avec la sonde Mitotracker RED CMXRos. 110

Figure 3. 1 : Types hémocytaires observés chez la moule zébrée *Dreissena polymorpha*. 115
Figure 3. 2 : Light micrographs of adherent hemocytes from *Dreissena polymorpha* after fixation and staining. 125
Figure 3. 3 : Flow cytometric analysis of *Dreissena polymorpha* hemolymph. 126
Figure 3. 4 : Comparison of hemocyte type phagocytic activity measured by flow cytometry during gametogenesis and spawning period. 129
Figure 3. 5 : Basal oxidative activity in *Dreissena polymorpha* hemocyte populations during gametogenesis or spawning period.. 130
Figure 3. 6 : Functional parameters from *Dreissena polymorpha* hemocyte populations during gametogenesis and spawning period.. 131

Figure 4. 1 : Dotplot presenting hemocyte populations according to their relative size (FSC-H) and complexity (SSC-H). 148
Figure 4. 2 : Effects of cadmium on hemocyte viability. 151

Figure 4. 3 : Effects of cadmium on phagocytic activity measurement..... 153
Figure 4. 4 : Effects of cadmium on functional parameters of hemocytes after 21 hours of exposure..... 154
Figure 4. 5 : Localisation du site de Pointe-des-Cascades où ont été prélevées les moules zébrées. 165
Figure 4. 6 : Système expérimental pour le maintien des moules zébrées et système de régulation de la température et du pH. 166
Figure 4. 7 : A : Suivi des températures lors de l'expérimentation de stress thermique. B : Suivi du pH lors de l'expérimentation de stress de pH..... 168
Figure 4. 8 : CE_{50} calculées pour l'activité de phagocytose (A) des hyalinocytes et (B) des granulocytes à l'issue de 21 heures d'exposition au cadmium lors de l'expérimentation de stress thermique. 177
Figure 4. 9 : CE_{50} calculées pour l'activité de phagocytose (A) des hyalinocytes et (B) des granulocytes à l'issue de 21 heures d'exposition au cadmium lors de l'expérimentation de stress de pH. 184

Figure 5. 1 : Réseau hydrographique du bassin versant de la Seine..... 201
Figure 5. 2 : Réseau hydrographique du Saint-Laurent 202
Figure 5. 3 : Localisation du site d'échantillonnage des moules zébrées sur la rivière Oise. 204
Figure 5. 4 : Répartitions des sites d'échantillonnage des moules zébrées dans le tronçon fluvial du Saint-Laurent. 205
Figure 5. 5 : Distribution hémocytaire mesurée lors des différents temps de prélèvements sur le site d'étude de la rivière Oise. 211
Figure 5. 6 : Viabilité hémocytaire mesurée lors des différents temps de prélèvements sur le site d'étude de la rivière Oise..... 211
Figure 5. 7 : Activité oxydative hémocytaire mesurée lors des différents temps de prélèvements sur le site d'étude de l'Oise. 212
Figure 5. 8 : CE_{50} sur la viabilité hémocytaires calculées pour les sites échantillonnés sur le fleuve Saint-Laurent..... 216

Figure 5. 9 : CE_{50} sur l'activité de phagocytose des (A) hyalinocytes et (B) granulocytes calculées pour les sites échantillonnés sur le fleuve Saint-Laurent. 218
Figure 5. 10 : Représentation graphique des descripteurs chimiques et biologiques (A) et des sites d'étude (B) dans les deux premiers facteurs de l'ACP 220
Figure 5. 11 : Vues latérales, ventrales et antérieures montrant les différences morphologiques entre *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis* . 227
Figure 5. 12 : Vues latérales, dorso-ventrales et antéro-postérieure de *Dreissena polymorpha* (A), *Dreissena rostriformis bugensis* de morphotype d'eaux peu profondes (B) et d'eau profondes (C). 228
Figure 5. 13 : Fragments de restriction obtenus après digestion par *RSA I* d'une région du gène codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase chez *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis*..... 234
Figure 5. 14 : Activité oxydative hémocytaire des hyalinocytes (A), Granulocytes (B) et blast-like (C) mesurées chez *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis* 239
Figure 5. 15 : CE_{50} calculée pour la viabilité hémocytaire après 21 heures d'exposition au cadmium chez *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis*..... 240

Liste des tableaux

Tableau 2. 1 : Composition du milieu de maintien hémocytaire L15-15% utilisé chez la dreissène. 89

Tableau 2. 2 : Différentes conditions d'utilisation de l'iodure de propidium observées dans la littérature pour évaluer la mortalité hémocytaire. 93

Tableau 2. 3 : Paramètres utilisés d'après la littérature pour mesurer l'activité de phagocytose chez les mollusques à l'aide de billes fluorescentes. 95

Tableau 2. 4 : Différents temps d'incubation observés dans la littérature utilisant le DCFH-DA à la concentration de 10 µM pour mesurer l'activité oxydative des hémocytes de mollusques. 103

Tableau 2. 5 : Différentes conditions de marquage observées dans la littérature utilisant la sonde Lysotracker afin d'étudier le contenu en lysosomes de cellules hémocytaires de mollusques. 108

Tableau 3. 1 : Cytological characterization of *Dreissena polymorpha* circulating hemocytes 125

Tableau 3. 2 : Hemocyte counts, distribution and mortality during gametogenesis and spawning period. 127

Tableau 4. 1 : Calculated EC_{50} for endpoints measured after 21 hours of exposure to cadmium. 155

Tableau 4. 2 : Paramètres hémolymphatiques structuraux mesurés lors de l'expérimentation de stress thermique. 172

Tableau 4. 3 : Paramètres fonctionnels hémocytaires mesurés dans le cadre de l'expérimentation de stress thermique. 174

Tableau 4. 4 : Paramètres hémolymphatiques structuraux mesurés lors de l'expérimentation de stress de pH. 179

Tableau 4. 5 : Paramètres fonctionnels hémocytaires mesurés dans le cadre de l'expérimentation de pH. 181

Tableau 5. 1 : Paramètres physico-chimiques relevés sur le site français de la rivière Oise lors des prélèvements. 204
Tableau 5. 2 : Paramètres physico-chimiques relevés sur les sites québécois sur le fleuve Saint-Laurent lors des prélèvements..... 206
Tableau 5. 3 : Concentrations en métaux mesurées dans les tissus de dreissènes lors des différents temps de prélèvement sur le site de la rivière Oise..... 210
Tableau 5. 4 : Données de contaminations mesurées dans le sédiment et les tissus de moules des sites échantillonnés 213
Tableau 5. 5 : Paramètres hémocytaires mesurés chez les moules zébrées issus des sites d'études du Saint-Laurent. 217
Tableau 5. 6 : Amorces utilisées dans l'étude..... 232
Tableau 5. 7 : Données de contaminations mesurées dans les tissus de *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis* sur les sites échantillonnés 235
Tableau 5. 8 : Comparaison des paramètres structuraux et fonctionnels hémolymphatiques mesurés chez *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis* 237

Liste des abréviations

A.U ou **U.A. :** Arbitrary Units ou Unité arbitraire
ABC : ATP Binding Cassette
ADC : Analog to Digital Converter
ADN : Acide désoxyribonucléique
AMP : AntiMicrobial Peptides
ARN : Acide ribonucléique
BL : Blast-like
BSA : Bovine serum albumin
CAT : Catalase
CEAEQ : Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
CFQCU : Conseil Franco-Québécois de Coopération Universitaire
CMF : Cytométrie en flux
CRSNG ou **NSERC :** Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada
CYP450 : Cytochrome P450
DCF : Dichlorofluorescéine
DCFH-DA : 2',7'-Dichlorofluorescin diacetate
EC_{50} ou **CE_{50} :** Concentration efficace 50
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
ERO ou **ROS :** Espèce réactive de l'oxygène
ETM : Element trace métallique
FREPs : Fibrinogen-Related Protein
FSC : Foward Scatter
GPx : Glutathion peroxydase
GST : Glutathion S-transférase
H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HClO : Acide hypochloreux
HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HSP : Heat Shock Protein
IP ou **PI :** Iodure de propidium
IPOC : Interaction entre la pollution et les changements climatiques
K-W : Kruskal-Wallis
LOEC : Low observed effect concentration
LPS : Lipopolysaccharide
MFI : Mean Fluorescence Intensity
MPO : Myéloperoxidase
MT : Métallothionéines
MXR : Multi Xenobiotic Resistance
NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen
ND : Non déterminé

NO : Oxyde nitrique
NOS : Oxyde nitrique synthase
NOX : NADPH oxydase
NS : Non spécifié
O_2^- : Ion superoxyde
$OH^\cdot$: Radical hydroxyl
$ONOO^-$: Ion peroxynitrite
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBDE : Polybromodiphényléther
PBS : Phosphate buffered saline
PCB : Polychlorobiphényle
PGN : Peptidoglycanes
PMA : Phorbol myristate acetate
PMT : Tube photomultiplicateur
PRRs : Pattern recognition receptors
REACH : Registration Evaluation and Autorisation of CHemicals
RNS : Reactive Nitrogen Species
ROS ou **ERO** : Espèce réactive de l'oxygène
SEM : Standard Error of Mean
SOD : SuperOxyde Dismutase
SSC : Side Scatter
TLR : Toll-Like Receptors

Introduction générale

Il est actuellement reconnu que les activités anthropiques, industrielles, agricoles et urbaines sont responsables de l'émission dans l'environnement de nombreuses substances chimiques. Les milieux aquatiques constituent des réceptacles de cette contamination qui affecte de façon insidieuse la qualité des masses d'eaux notamment continentales. La présence de ces contaminants dans les hydrosystèmes peut engendrer des effets nuisibles importants sur les écosystèmes aquatiques aboutissant à des conséquences néfastes en termes de services écosystémiques. Parmi les principaux contaminants retrouvés dans l'environnement, on distingue les métaux des contaminants organiques tels que les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les polychlorobiphényles. Depuis plusieurs années, l'amélioration des techniques analytiques a permis de détecter la présence de polluants qualifiés d'émergeants tels que les résidus pharmaceutiques ou les nanoparticules dont la présence n'est pas surveillée de façon pérenne dans les milieux. A cela s'ajoute la présence de contaminants d'origine biologique et notamment microbienne dont les impacts sur les biocénoses aquatiques demandent à être précisés.

L'Union Européenne a mis en place une politique visant à définir un cadre de gestion des eaux continentales et marines et fixe l'objectif d'atteindre un bon état écologique de ces masses d'eau (DCE et DCSMM). Ceci implique la mise en place de descripteurs physico-chimiques et biologiques permettant de définir la qualité des masses d'eau au regard de la pression chimique qui s'exerce à leurs niveaux.

Au sein des écosystèmes aquatiques, cette contamination diffuse et diversifiée des eaux est associée à des modulations plus ou moins marquées de variables écologiques imputables en partie aux conséquences actuelles et à venir du dérèglement climatique. Les modèles de changements climatiques prédisent en effet une hausse des températures des eaux de surface comprise entre 1,3 et 4,5°C pour les 50 à 100 prochaines années (Morgan *et al.*, 2001). Ces modifications de paramètres physico-chimiques des eaux continentales pourraient générer des conditions contraignantes entraînant la redistribution d'espèces et l'extinction de populations vivants en limite de tolérance écologique (Sunday *et al.*, 2012). Les interactions entre les variables liées aux changements climatiques et les contaminants chimiques et biologiques présents dans

les hydrosystèmes continentaux peuvent conduire, à l'échelle des organismes, à des situations de stress multiples, contribuant ainsi à l'érosion de la biodiversité des milieux aquatiques d'eaux douces. Par conséquent, les études d'évaluation des risques se doivent de considérer les facteurs environnementaux dans la globalité de leurs interactions.

L'évaluation de la qualité des milieux aquatiques, qu'ils soient marins ou dulçaquicoles repose depuis plusieurs années sur l'utilisation de deux approches complémentaires : le contrôle des paramètres physico-chimiques et la quantification de paramètres biologiques. L'analyse chimique permet de détecter précisément la présence de polluants dans divers compartiments tels que l'eau et les sédiments. Cependant, bien qu'indispensable, cette approche possède plusieurs limites : ponctuellement, elle ne permet pas de détecter les contaminations passées, cette méthodologie ne peut pas être exhaustive étant donnée la grande diversité de composés présents et elle ne reflète pas l'état de santé général de l'écosystème considéré. En effet, les données de chimie recueillies ne permettent pas de déterminer si les contaminants détectés exercent des effets toxiques aux concentrations mesurées et il n'est pas possible d'en déduire les conséquences sur les populations. Par conséquent, les études de surveillance environnementale s'appuient également sur la composante biologique. Celle-ci est basée sur l'étude de marqueurs biologiques à différents niveaux d'organisation et d'intégration, allant de la communauté (indices biocénotiques) jusqu'aux niveaux individuels et infra-individuels (biomarqueur) au travers de mécanismes sous-jacents aux grandes fonctions physiologiques (Figure 1). Deux méthodologies peuvent être envisagées en biosurveillance : la première, qualifiée de passive, consiste en l'étude des contaminations et leurs effets sur des populations établies et permet d'établir un suivi de la contamination dans le temps. La seconde méthodologie est la surveillance active, son principe est d'importer des organismes depuis un élevage ou un site de référence vers des sites contaminés.

Un biomarqueur se définit comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, cellulaire, de l'organisme (physiologie, comportement), de la population et de l'écosystème qui peut être relié à une exposition ou à des effets

toxiques de polluants chimiques environnementaux (Lagadic *et al.,* 1997). Ces changements peuvent résulter de l'interaction directe entre un polluant et un récepteur biologique ou des effets issus de cette interaction (au niveau métabolique, physiologique…) Ces outils sont présentés comme ayant un caractère intégrateur des effets toxiques du fait que l'organisme exposé aux contaminants n'intègrent que la fraction biodisponible des composés.

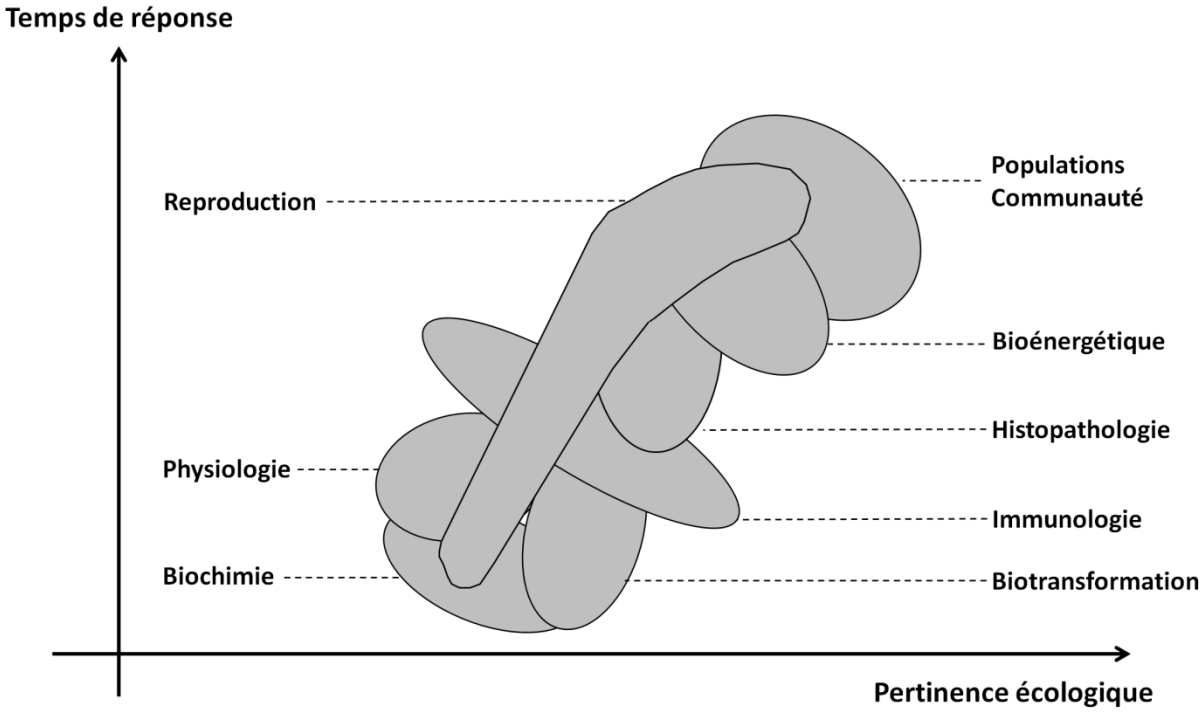


Figure 1 : Relation entre pertinence écologique et temps de réponse des différents niveaux d'organisation utilisés en biosurveillance (D'après Van der Oost et al., 2003).

Les effets observables à un certain niveau d'organisation sont toujours précédés de changements plus précoces à un niveau inférieur. Par exemple, si un contaminant exerce des effets néfastes sur des paramètres biochimiques, à partir d'un certain seuil ou temps d'exposition, ces changements biochimiques peuvent aboutir à des effets physiologiques (Figure 2). Ces signaux peuvent être mesurés de façon précoce, ce qui permet de faire un lien avec les niveaux d'organisation supérieurs (Moore *et al.,* 2004). L'utilisation de biomarqueurs permettant de détecter des réponses à l'échelle des tissus,

des cellules ou subcellulaire a été démontrée comme étant intéressante d'un point de vue écologique (Galloway *et al.*, 2004).

Les biomarqueurs sont classiquement divisés en 3 catégories selon les mécanismes de toxicité (Lagadic *et al.,* 1997) :

- Les biomarqueurs d'exposition indiquent que le polluant a pénétré dans l'organisme et permettent de mettre en évidence une exposition actuelle ou passée à un contaminant (exemple : adduits à l'ADN)
- Les biomarqueurs d'effet permettent de montrer qu'après avoir interagi avec l'organisme, le xénobiotique a exercé un effet toxique ou non sur une cible. Ces marqueurs sont typiquement utilisés lors de tests en laboratoire.
- Les biomarqueurs de sensibilité indiquent une modification de la capacité de l'organisme à répondre à l'exposition à un xénobiotique par exemple, une diminution de sensibilité à un insecticide par une espèce d'insecte : apparition d'une résistance à l'insecticide.

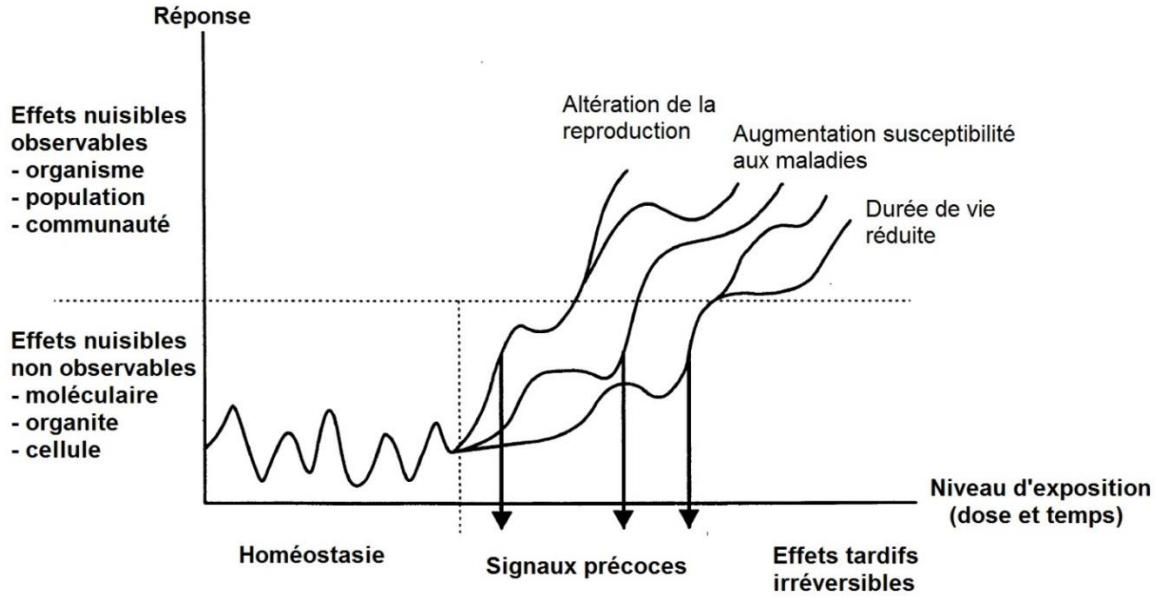


Figure 2: Schéma de réponse des organismes aux effets néfastes engendrés par l'exposition à un polluant (modifié d'après Van der Oost et al., 2003).

En 2000, De Lafontaine *et al.,* ont proposé une classification qui est aujourd'hui largement utilisée et qui permet de différencier les biomarqueurs en deux catégories :

- Les biomarqueurs de défense, qui correspondent à des mécanismes permettant à l'organisme de survivre dans un environnement détérioré. Le coût énergétique de ce mécanisme à impact positif sur l'organisme se réaliserait au dépend d'autres mécanismes physiologiques. Ces biomarqueurs regroupent les activités enzymatiques de biotransformation des xénobiotiques (CYP450, GST…), les défenses antioxydantes (CAT, GPx, SOD…) et les protéines de régulation de l'homéostasie (métallothionéines, HSP…).
- Les biomarqueurs de dommages qui correspondent à des atteintes biologiques entraînant l'incapacité à se reproduire ou survivre. Ils regroupent les biomarqueurs de génotoxicité (adduits à l'ADN, cassures des brins d'ADN...) et les indicateurs de toxicité des grandes fonctions physiologiques (neurotoxicité, immunotoxicité, reprotoxicité…).

De bons biomarqueurs sont des indices sensibles à la fois de la biodisponibilité d'un polluant et des réponses biologiques précoces. Ces outils peuvent donner un aperçu du mécanisme d'action potentiel d'un xénobiotique.

Etant donnée la diversité importante des contaminants et la variété des atteintes biologiques qu'ils peuvent générer, l'utilisation d'une approche intégrée basée sur l'utilisation conjointe de plusieurs biomarqueurs est de plus en plus répandue. Ce procédé permet la mise en évidence des effets toxiques à plusieurs niveaux d'organisation chez un même individu ou sur plusieurs cibles d'une même composante physiologique.

Parmi les grandes fonctions physiologiques, le système immunitaire constitue un mécanisme d'intérêt majeur pour refléter l'état de santé des individus. En effet, une altération des fonctions immunitaires peut rapidement entrainer une morbidité voire une mortalité des individus (Fournier *et al.*, 2000). De plus, l'efficacité du système immunitaire d'une espèce peut être compromise lorsqu'elle se trouve en dehors de sa gamme de tolérance environnementale et devenir plus susceptible aux pathogènes (Callaway *et al.*, 2012). Chez les mollusques, cette fonction est principalement assurée

par les hémocytes qui sont des cellules circulantes impliquées dans de multiples fonctions physiologiques et sont garantes du maintien de l'homéostasie des individus. Par conséquent, l'étude des fonctions hémocytaires constituent une cible de choix pour être utilisées en tant que descripteur de l'état de santé. De plus, une étude basée sur la comparaison de sensibilité aux métaux du système immunitaire entre plus de 30 espèces animales a révélé que les bivalves faisaient partie des plus sensibles, ce qui en fait un modèle pertinent en immunotoxicologie (Salo *et al.*, 2005).

En biosurveillance écotoxicologique, le développement de biomarqueurs possédant une spécificité de réponse à un contaminant précis est un utopisme. Un biomarqueur peut s'avérer pertinent dans un contexte particulier et ne pas répondre sous certaines conditions. Ces conditions varient selon un nombre important de facteurs qualifiés de confondants ou de confusion, pouvant potentiellement influencer la physiologie de l'organisme et moduler en conséquence la réponse du marqueur étudié. Une première catégorie concerne les facteurs intrinsèques tels que l'âge, le sexe, les caractéristiques génétiques de l'espèce ou son statut reproducteur. Une seconde catégorie de facteurs confondants concerne les facteurs extrinsèques qui regroupent les facteurs abiotiques comme la température, le pH ou la salinité et les facteurs biotiques tels que les compétitions inter ou intraspécifiques, le parasitisme, la prédation… .

Bien que ces facteurs puissent être limités lors d'expérimentations en milieu contrôlé, l'interprétation des réponses mesurées sur le terrain peut devenir rapidement compliquée par la présence simultanée de tous ces facteurs et de leurs interactions sur la physiologie des espèces. Pour pallier au mieux les contraintes expérimentales, il est nécessaire d'avoir de bonnes connaissances sur l'écophysiologie de l'espèce étudiée.

Le projet IPOC (Interaction entre la Pollution et les Changements climatiques : développement d'une nouvelle stratégie de surveillance) est un projet international supporté par l'agence nationale de la recherche (ANR) en France et par le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG). Ce projet est piloté en France par le professeur Michel Auffret du laboratoire LEMAR de l'Université de Brest Occidentale et au Canada par le professeur Michel Fournier du laboratoire d'immunotoxicologie de l'environnement à l'institut Armand-Frappier de l'INRS. Ce projet

vise à déterminer la vulnérabilité d'écosystèmes aquatiques subissant les effets conjugués de la pollution et des changements climatiques, en évaluant la sensibilité d'espèces bivalves sentinelles sur un continuum entre le milieu marin et dulçaquicole. Le projet propose une stratégie de surveillance à partir d'une approche écophysiologique et écotoxicologique assurée par l'intervention de nombreux collaborateurs : Biodôme de Montréal, UMR BOREA (Caen), CEAEQ, Centre TOXEN (UQAM), Environnement Canada, Institut Maurice-Lamontagne Ministère Pèche et Océans Canada, INRS-IAF, UMR Sebio (Le Havre & Reims), UMR LIEC (Metz), UMR LEMAR (Brest), Aquarium de Québec, Université de l'Île-du-Prince-Édouard. Les travaux menés par ces équipes ont pour objectif la mise en place d'une « boîte à outils » permettant l'étude des réponses de la moule bleue et la moule zébrée à différents niveaux d'intégration en réponse à des stress d'origines abiotiques et anthropogéniques. Les expérimentations en conditions contrôlées couplées à des observations sur le terrain à une large échelle géographique permettront la mise au point de cet ensemble d'outils diagnostiques.

Dans ce contexte, l'objectif des travaux présentés dans ce manuscrit est de développer les outils analytiques permettant d'étudier les réponses hémocytaires de la moule zébrée *Dreissena polymorpha*. Ce développement implique de caractériser la structure des populations hémocytaires ainsi que leurs fonctionnalités propres. La caractérisation des réponses hémocytaires sous des conditions ambiantes naturelles ainsi que la connaissance des modulations des paramètres hémocytaires engendrées par des modifications de l'environnement et la physiologie de l'organisme sont essentielles pour la mise en place d'un outil diagnostique de qualité. Etant donnée la multiplicité des sources pouvant générer un stress sur les mécanismes étudiés, il est primordial d'utiliser des approches complémentaires permettant d'avoir une vision globale des réponses hémocytaires. Les travaux scientifiques présentés reposent sur l'association d'études réalisées avec des approches *ex vivo*, *in vivo* et *in situ* afin d'étudier les réponses adaptatives à différentes échelles biologiques (Figure 3). Les résultats obtenus permettront d'améliorer la compréhension des mécanismes adaptatifs des dreissènes et de leurs hémocytes face à des changements environnementaux.

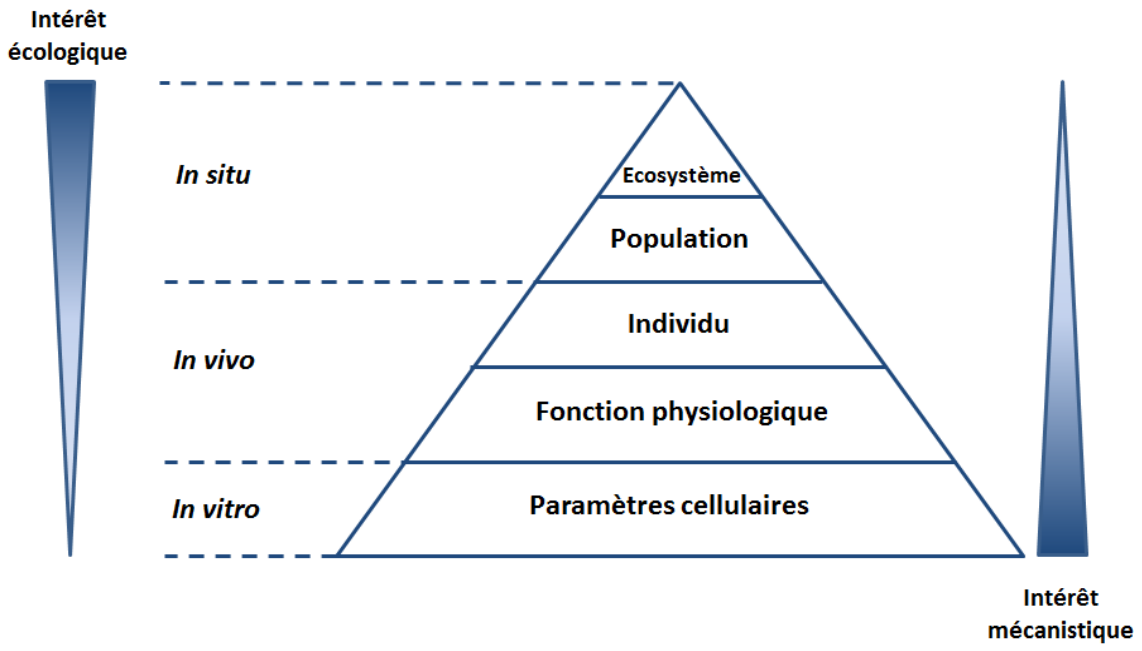


Figure 3 : Représentation des différents niveaux d'organisation étudiés dans ces travaux de thèse ainsi que leurs intérêts écologiques et mécanistiques (Modifié d'après Snape et al., 2004).

Ce manuscrit de thèse s'articule autour de six parties. Le premier chapitre permet de resituer le « **contexte bibliographique** » afin de poser les bases permettant la compréhension des concepts abordés dans ce sujet de thèse. Le second chapitre est consacré aux « **bases méthodologiques** » permettant de décrire la technique de cytométrie de flux et de présenter la mise au point des protocoles utilisés pour ces travaux. Le **chapitre 3** est consacré à la caractérisation des populations hémocytaires chez la dreissène ainsi qu'à l'étude de leurs fonctionnalités au cours de deux périodes contrastées d'un point de vue physiologique afin d'appréhender si la ponte constitue un facteur pouvant influencer les marqueurs étudiés. Le **chapitre 4** regroupe les expérimentations menées en laboratoire. La première partie repose sur l'utilisation des marqueurs hémocytaires fonctionnels après exposition *ex vivo* au cadmium afin de tester la sensibilité des différents marqueurs mais aussi d'analyser les différences de réponse entre les types hémocytaires. La seconde partie consiste en des expérimentations menées en milieux contrôlés afin de tester si des variations de la

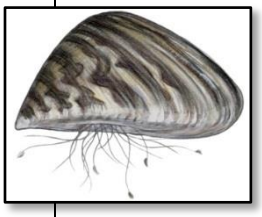
température ou du pH peuvent entraîner des modulations des paramètres hémocytaire chez la dreissène lors d'expositions *in vivo*. Le **chapitre 5** présente les études réalisées sur le terrain en France afin d'étudier l'évolution temporelle des marqueurs hémocytaires structuraux et au Québec pour étudier les réponses des marqueurs sur des sites présentant des niveaux de contaminations contrastés. Enfin la dernière partie « **synthèse générale et perspectives** » permet de faire un point sur les résultats recueillis et d'aborder les recherches à poursuivre.

Chapitre 1 : Contexte bibliographique

I. Le modèle biologique : Dreissena polymorpha (Pallas 1771)

I.1. Taxonomie

Selon les estimations, l'embranchement des mollusques compte plus de 100 000 espèces. La moule zébrée, *Dreissena polymorpha,* décrite en 1771 par Peter Simon Pallas est un métazoaire, protostomien, lophotrochozoaire. C'est un mollusque bivalve hétérodonte (dents cardinales et latérales réduites) de la famille des dreissénidés (coquille allongée à face ventrale aplatie et dorsale angulaire et dont la charnière est sans dents). La classification est détaillée figure 1.1.



Règne	***Animalia***
Sous-règne	***Bilateria***
Rameau	***Protostomia***
Super-embranchement	***Lophotrochozoa***
Embranchement	***Mollusca***
Classe	***Bivalvia***
Sous-classe	***Heterodonta***
Ordre	***Veneroida***
Super-famille	***Dreissenoidea***
Famille	***Dreissenidae***
Genre	***Dreissena***
Espèce	***polymorpha* (Pallas, 1771)**

Figure 1. 1 : Taxonomie détaillée de *Dreissena polymorpha* d'après l'ITIS : Integrated Taxonomic Information System (2014).

I.2. Cycle de vie de la dreissène

La moule zébrée *Dreissena polymorpha* est une espère gonochorique sans dimorphisme sexuel apparent, à fécondation externe. Elle possède une phase larvaire planctonique que l'on retrouve chez de nombreuses espèces marines, ce qui constitue une exception pour les mollusques d'eau douce (Figure 1.2). Ce type de développement est également retrouvé chez *Mytilopsis leucophaeta* qui vit préférentiellement en eau

saumâtre. Les autres espèces d'eau douce possèdent des larves parasites (Unionidés) ou qui se développent dans la cavité palléale avant d'être libérées (Corbiculidés) (Sprung 1993).

Les dreissénidés sont des espèces à « stratégie r » à maturité sexuelle rapide (dès le stade 6 mm). En période de reproduction, les femelles peuvent pondre de trente mille à un million d'ovocytes de façon synchrone avec les mâles. Après fertilisation, les segmentations aboutissent à la formation d'une larve trochophore (8 à 48 heures dépendant de la température). Elle devient ensuite une larve véligère nageuse. Deux à sept jours après fertilisation, la larve sécrète via la glande coquillère une coquille en forme de D et devient une larve prodissoconque I également appelée larve D. Le manteau sécrète ensuite une seconde coquille présentant une région umbonale caractéristique de la larve prodissoconque II (7-9 jours post fécondation) qui est le dernier stade planctonique. A ce stade, la larve va croître et de nouveaux organes se forment, notamment le pied (larve pedivéligère) qui permet la fixation de l'individu au substrat pour qu'il puisse réaliser la métamorphose (18 à 90 jours post fécondation). La coquille de l'individu prend rapidement la forme triangulaire caractéristique des dreissenidés et devient un juvénile qui entre en phase de croissance et d'acquisition de la maturité sexuelle (Figure 1.2) (Ackerman 1994).

Le cycle de gamétogenèse de la moule zébrée s'étale sur une année complète et est caractérisé par un développement gonadique en hiver, une phase de maturation des gamètes en fin de période hivernale et au début du printemps pour une ponte en début d'été et une phase de repos durant l'automne (Juhel *et al.*, 2003 ; Palais *et al.*, 2011 ; Delmott & Edds 2014 ; Knigge *et al.*, 2014).

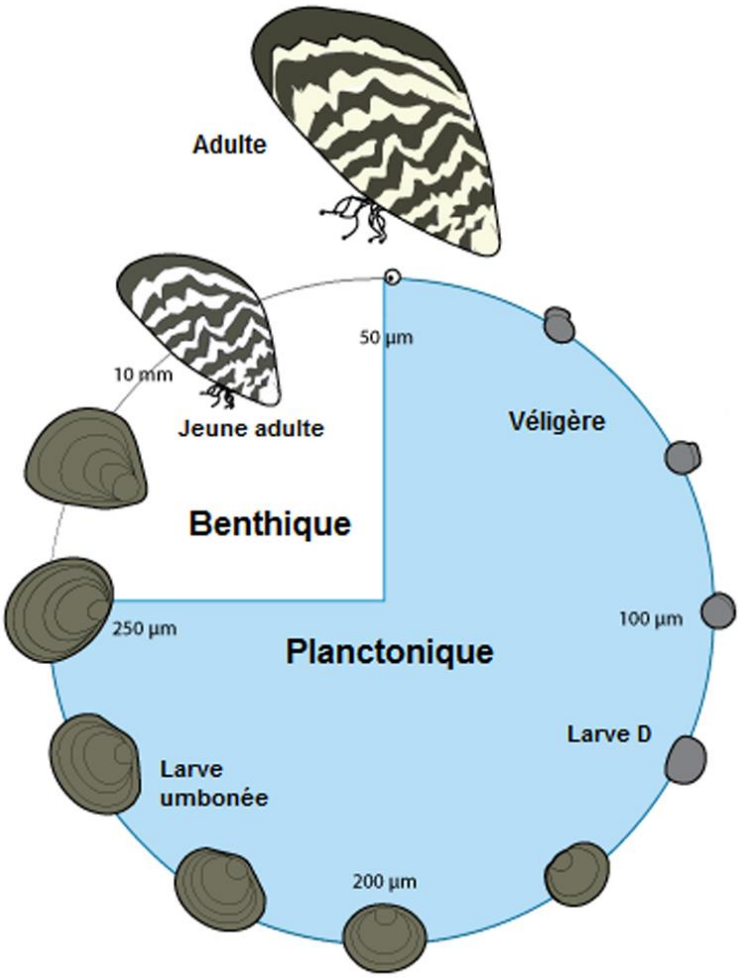


Figure 1. 2 : Schéma du cycle de vie de la moule zébrée, *Dreissena polymorpha*.

I.3. Ecologie de la dreissène

L'IUCN a classé la dreissène parmi les 100 espèces exotiques les plus envahissantes au monde (Lowe *et al*., 2008). Du fait de son caractère invasif, elle est aujourd'hui largement répandue dans les eaux douces stagnantes (lacs et étangs) ainsi que dans les réseaux fluviaux d'Europe et d'Amérique du Nord. Elle vit préférentiellement fixée sur toute sorte de substrats durs : pierres, pilotis, branches, autres bivalves… . L'espèce est originaire des bassins de drainage de la région Ponto-Caspienne qui s'étend de la Mer Noire à la Mer Caspienne. Elle a progressivement colonisé les cours d'eau européens au 19e siècle avec le développement des transports fluviaux avant d'atteindre dans les années 1980 le continent Nord-Américain (Figure 1.3) (Hebert *et al.*, 1989).

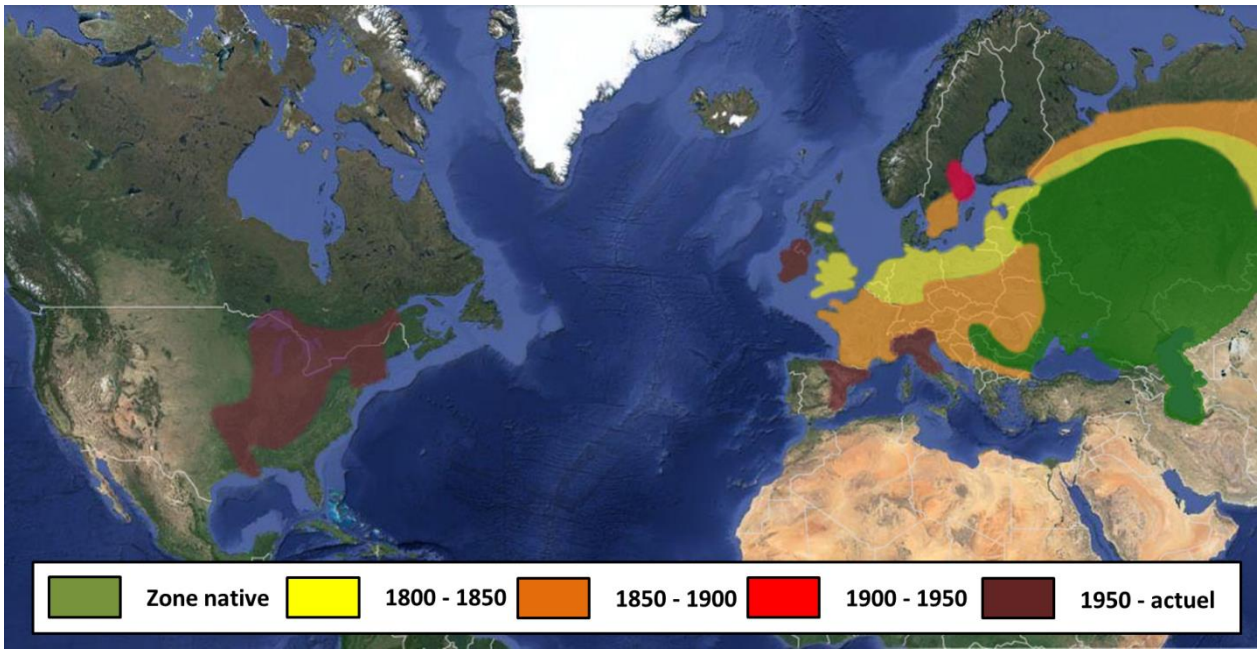


Figure 1. 3 : Carte exposant la propagation de la moule zébrée, *Dreissena polymorpha*, en Europe et en Amérique du Nord. Adaptée d'après Morton 1993.

Cette colonisation rapide des écosystèmes a été favorisée par certains caractères biologiques comme son fort taux de fécondité, son stade larvaire planctonique permettant sa dissémination et sa capacité d'attachement au substrat. Des densités allant jusqu'à 700 000 individus par mètre carré ont été mesurées dans la région des Grands Lacs en Amérique du Nord (Griffiths *et al.*, 1991). Une telle invasion provoque au sein des écosystèmes de nombreuses modifications qui lui valent d'être reconnue comme espèce ingénieure (Karatayev *et al.*, 2002 ; Cuhel & Aguilar 2013) (Figure 1.4). La colonisation des moules Unionidés avec lesquelles elles vivent en sympatrie empêche leur comportement d'enfouissement et entraîne des mortalités importantes des populations natives (Mackie 1991 ; Schloesser *et al.*, 1996). En tant que filtreur suspensivore, la dreissène peut atteindre des taux de filtration de 400 $mL.h^{-1}.mussel^{-1}$ et possède une forte capacité de rétention de particules d'une large gamme tailles (Jorgensen *et al.*, 1984 ; Ackerman 1999 Roditi *et al.*, 1996 ; Baldwin *et al.*, 2002).

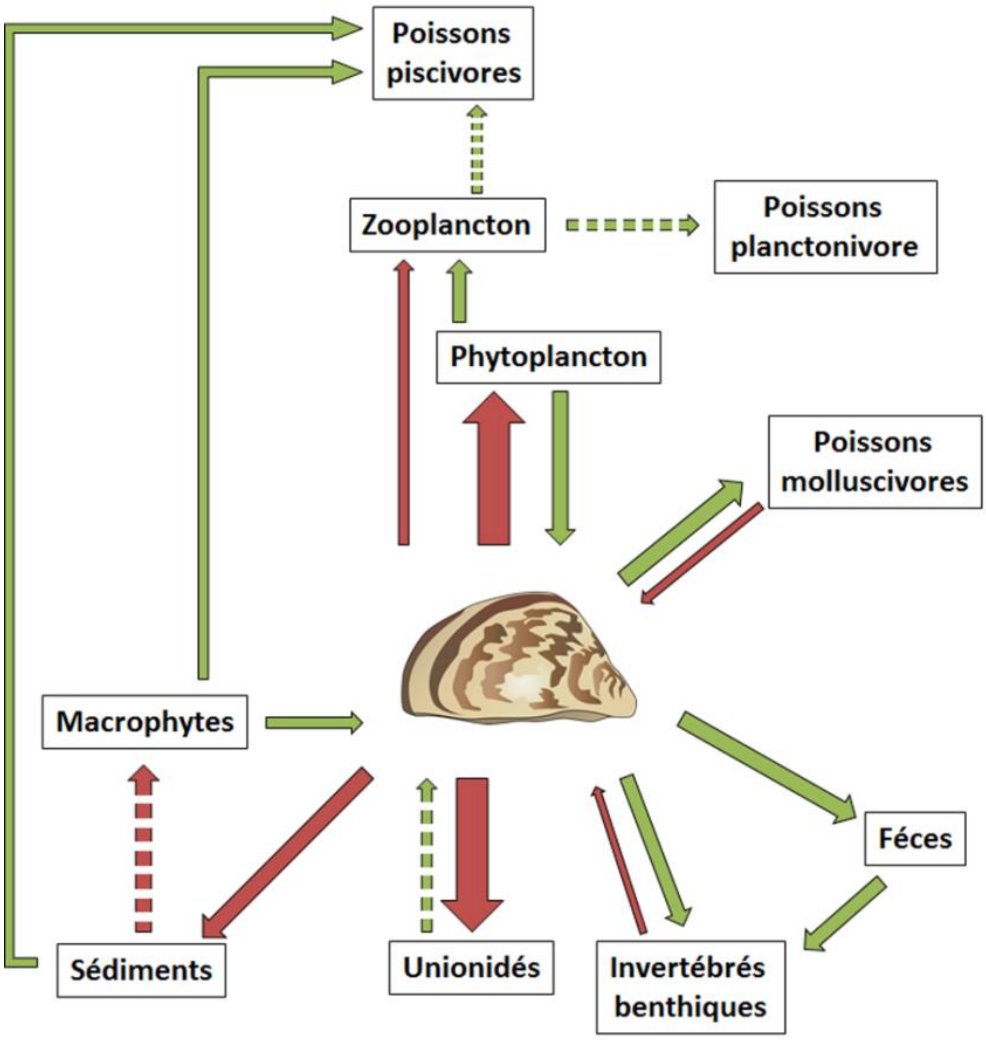


Figure 1. 4 : Schéma des impacts observés (flèches pleines) ou potentiels (flèches pointillées) de la moule zébrée sur les écosystèmes en Europe et Amérique du Nord. Les flèches vertes indiquent des effets positifs, les flèches rouges des effets négatifs (Adapté de MacIsaac 1996).

Les particules sont en partie ingérées alors que le reste sera déposé au travers de pseudoféces entraînant un transfert de matière en suspension depuis la colonne d'eau vers le benthos. Cette biodéposition crée de nouvelles niches écologiques pour les invertébrés benthiques et favorise leur développement (Fanslow *et al.*, 1995 ; Stewart *et al.*, 1998 ; Kuhns & Berg 1999). L'alimentation en continu des moules zébrées altère la chaîne trophique en réduisant drastiquement la biomasse de phytoplancton, conduisant à une diminution de biomasse en zooplancton et par conséquence à une disponibilité

moindre pour les jeunes poissons (Holland 1993 ; MacIsaac 1996 ; Bastviken *et al.*, 1998). La dreissène est également le premier hôte intermédiaire du trématode *Bucephalus polymorphus* qui affecte les populations de cyprinidés (Molloy *et al.*, 1997 ; Lajtner *et al.*, 2008). La présence de populations de dreissénidés modifie également certains paramètres abiotiques. Les besoins en minéraux pour la croissance des coquilles sont responsables d'une diminution de concentration en calcium dans l'eau, ce qui entraîne des modifications de pH (Barbiero *et al.*, 2006).

I.4. Besoins environnementaux

La moule zébrée a colonisé des environnements aquatiques de caractéristiques physico-chimiques très variées, ce qui nécessite une bonne capacité d'adaptation physiologique ou de tolérance (McMahon 1996). Après dispersion des larves, certaines conditions sont nécessaires pour l'établissement des populations dans des zones permettant la survie, le développement et la reproduction des individus. Il apparait que la température, le pH et la teneur en calcium de l'eau soient les facteurs limitants l'invasion (Mackie & Schloesser 1996).

La tolérance thermique des individus a été déterminée comme étant comprise entre 0 et 33 °C avec des différences de tolérance selon l'intensité de variation de température (McMahon *et al.*, 1995 ; Spidle *et al.*, 1995 ; Karatayev *et al.*, 2007). La température conditionne également la ponte des individus qui ne se déclenche pas sous 12°C et est maximisée autour de 17°C (McMahon 1996 ; Ram *et al.*, 1996). La température est un paramètre qui affecte également la croissance larvaire qui est optimale à 18°C (Sprung 1993). Le calcium est une composante essentielle de la coquille des bivalves et le seul ion indispensable au développement des larves. Ce développement sera assuré pour une concentration calcique d'au moins 12 $mg.L^{-1}$, alors qu'au moins 28 $mg.L^{-1}$ seront nécessaires pour assurer la croissance des adultes et leur reproduction (Neary & Leach, 1991 ; Sprung 1993). Pour le pH, des populations de dreissènes ont été observées dans des eaux possédant un pH allant de 7 à 9 avec une limite à 7.4 pour le développement des larves (Bowman & Bailey 1998).

Les paramètres physico-chimiques de l'eau vont donc influencer les activités physiologiques de cette espèce et définir sa répartition géographique. De nombreuses études ont été publiées dans les années 1990 par des équipes américaines lors de l'arrivée de la dreissène sur leur continent. Ces travaux de modélisation de dispersions de l'espèce s'appuient principalement sur des réponses physiologiques mesurées lors d'études européennes et certaines différences de tolérances aux conditions environnementales peuvent apparaître entre les populations des deux continents (Mackie et Schloesser 1996 ; McMahon *et al.*, 1996).

I.5. Anatomie de l'espèce

La dreissène *D.polymorpha* possède deux valves symétriques d'une taille maximale comprise entre 3 et 5 centimètres jointes par un ligament. La moule zébrée tire son nom vernaculaire de la pigmentation de la couche extérieure de sa coquille ou périostracum qui présente une alternance de bandes foncées et claires. Le nom d'espèce « *polymorpha* » est dû à la grande diversité de formes et colorations de la coquille qui dépendent de différents facteurs comme le substrat, la profondeur ou de la densité d'agrégation des individus… .

La masse viscérale est couverte par le manteau qui délimite la cavité palléale dans laquelle se trouvent le pied et les branchies. Cette enveloppe tégumentaire, responsable de la sécrétion de la coquille et du mucus, est soudée en partie dorsale et possède des ouvertures au niveau du siphon inhalant et exhalant (Morton 1969a). Sur la partie ventrale de l'animal, on retrouve le pied musculeux permettant le déplacement sur les substrats et la sécrétion du byssus qui assure la fixation au substrat (Bonner & Rockhill 1994). Dans la partie dorsale postérieure de la coquille sont insérés le muscle adducteur et le rétracteur du byssus qui permettent les mouvements des valves et du pied (Figure 1.5).

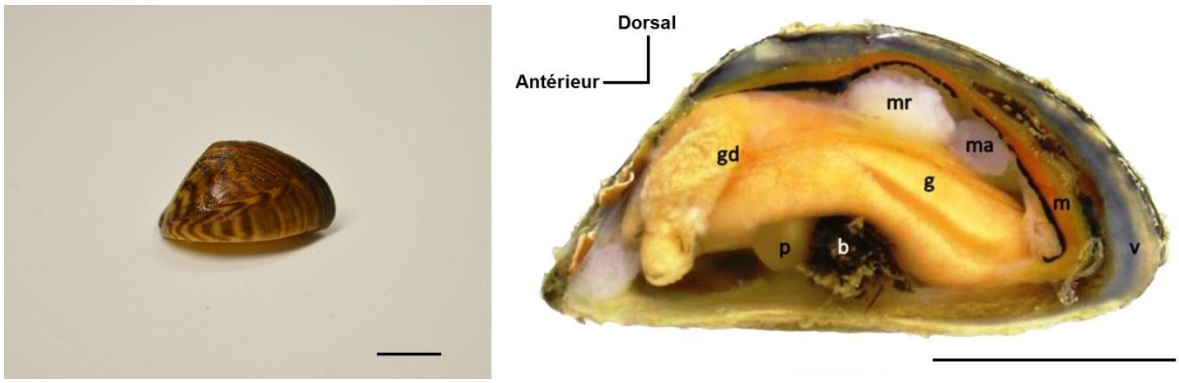


Figure 1. 5 : Anatomie externe et interne de la dreissène. gd : glande digestive, p : pied, mr : muscle antérieur rétracteur du byssus, b : byssus, g : gonade, ma : muscle adducteur, m : manteau, v : valve. Barre = 1 cm (modifié d'après Palais 2011).

I.5.1. Le système hémolymphatique

La dreissène possède un système circulatoire semi-ouvert, c'est-à-dire que l'hémolymphe n'est pas complètement endiguée dans des vaisseaux. Le cœur, protégé par le péricarde, est situé dans la partie antérieure de l'animal sous le ligament. Il est composé de trois chambres, un ventricule médian (traversé par le rectum) et deux oreillettes latérales. Il propulse l'hémolymphe à travers une aorte antérieure et une postérieure qui débouchent dans des lacunes tissulaires afin d'assurer l'oxygénation et les échanges de nutriments. L'hémolymphe est ensuite dirigée vers les reins afin d'être épurée, puis vers les branchies afin d'être ré-oxygénée avant de revenir au cœur via les oreillettes (Toureng 1894).

II. Les hémocytes : cellules clefs dans la physiologie des bivalves

Chez les bivalves, les hémocytes sont les cellules circulantes dans l'hémolymphe possédant la capacité de s'infiltrer dans les tissus. Par conséquent, ces cellules peuvent être retrouvées dans tous les organes. Du fait de leurs multiples fonctionnalités,

elles possèdent une implication dans de nombreux processus physiologiques ce qui leur confère un rôle clef dans le maintien de l'homéostasie.

II.1. Les différents types hémocytaires : diversité observable

Depuis les premiers travaux sur l'étude des types hémocytaires des mollusques, il y a eu de multiples interprétations sur le nombre de types cellulaires retrouvé. Chez les mollusques, la classification des cellules hémocytaires repose principalement sur des critères morphologiques tels que la taille, le rapport nucléocytoplasmique et leurs affinités tinctoriales.

Un premier système a été proposé en 1891 par Cuénot afin de classifier les hémocytes en trois catégories de la façon suivante : les hémocytes faiblement granuleux, fortement granuleux et les cellules avec peu de cytoplasme autour du noyau.

Une seconde classification a été attribuée à Takatsuki en 1934, elle impliquait la distinction entre deux catégories : les cellules granulaires et les hyalinocytes. C'est à ce jour la classification la plus commune. Ainsi, l'existence de deux grandes catégories de types hémocytaires est acceptée de façon consensuelle par la communauté scientifique (Cheng 1981 ; Hine 1999):

- Les hémocytes granulaires ou granulocytes, caractérisés par la présence de nombreuses granules cytoplasmiques et par un noyau de petite taille entouré d'un cytoplasme abondant (rapport nucléocytoplasmique faible)
- Les hémocytes agranulaires ou hyalinocytes définis par la présence en très faible nombre ou l'absence de granules cytoplasmiques. Ce groupe est considéré comme étant plus hétérogène.

Ces catégories regroupent des types cellulaires hétérogènes. Pour les granulocytes, la distinction entre les types cellulaires se fera principalement sur la base des affinités tinctoriales des granules qui peuvent être acidophiles, neutrophiles ou basophiles ou être composées d'un panachage de ces types de granules (Chang *et al.*, 2005 ; Aladaileh *et al.*, 2007). Les granules caractéristiques de ce type hémocytaire peuvent

être constituées par des lysosomes ou des vésicules de sécrétion (Cajaraville & Pal 1995). Les cellules agranulaires peuvent regrouper des cellules de tailles et de conformations variables. Généralement, deux catégories sont distinguées : les cellules de petites tailles dont le noyau est entouré par peu de cytoplasme et les cellules de grandes tailles dont le cytoplasme est très développé (Hine 1999).

D'après les données de la littérature, la répartition de ces types cellulaires au sein de l'hémolymphe est variable entre les classes du phylum des Mollusques. On retrouve par exemple chez les céphalopodes comme *Sepia officinalis* une population hémocytaire unique alors que chez le gastéropode *Haliotis tuberculata*, deux populations sont observées et trois sous-populations sont observées chez le bivalve *Mytilus edulis* (Figure 1.6) (Le Pabic *et al.*, 2014 ; Travers *et al.*, 2008 ; Le Foll *et al.*, 2010).

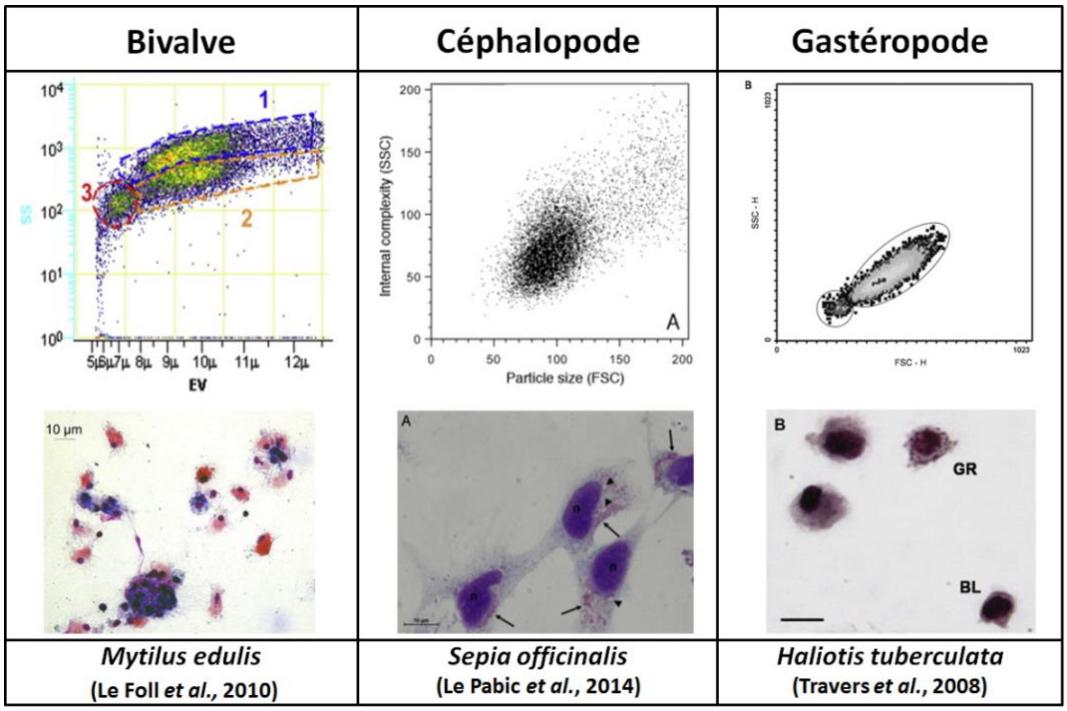


Figure 1. 6 : Représentation de la diversité des types hémocytaires observés chez plusieurs classes de mollusques au travers d'études en cytométrie de flux et cytologie.

De façon générale, entre une et trois populations hémocytaires sont retrouvées dans l'hémolymphe des mollusques. Dans le cas d'une population unique, elle peut aussi bien

être composée de granulocytes comme dans le cas de la seiche *Sepia officinalis* ou bien de hyalinocytes, dans le cas de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (Auffret 1988 ; Le Pabic *et al.*, 2014). Quand deux populations cellulaires sont observées, elles peuvent être composées de cellules granulaires et agranulaires comme chez la moule verte, *Perna viridis*, mais aussi de deux populations agranulaires dans le cas de l'ormeau *Haliotis tuberculata* (Donaghy *et al.*, 2011 ; Travers *et al.*, 2008). Pour les espèces présentant trois types hémocytaires, on retrouve généralement des granulocytes et des agranulocytes. Ces différences entre les classes de mollusques apparaissent également au sein d'une même classe (Figure 1.7). Bien qu'une certaine homogénéité semble apparaître si l'on considère les huîtres dites « vraies » et perlières tropicales (*Ostreoida* et *Pterioida*) qui étaient anciennement regroupées au sein d'un même ordre, des différences plus marquées apparaissent pour d'autres ordres. C'est le cas pour celui des *Veneroida* qui regroupe des espèces de palourdes et les dreissénidés dont la moule zébrée *Dreissena polymorpha*.

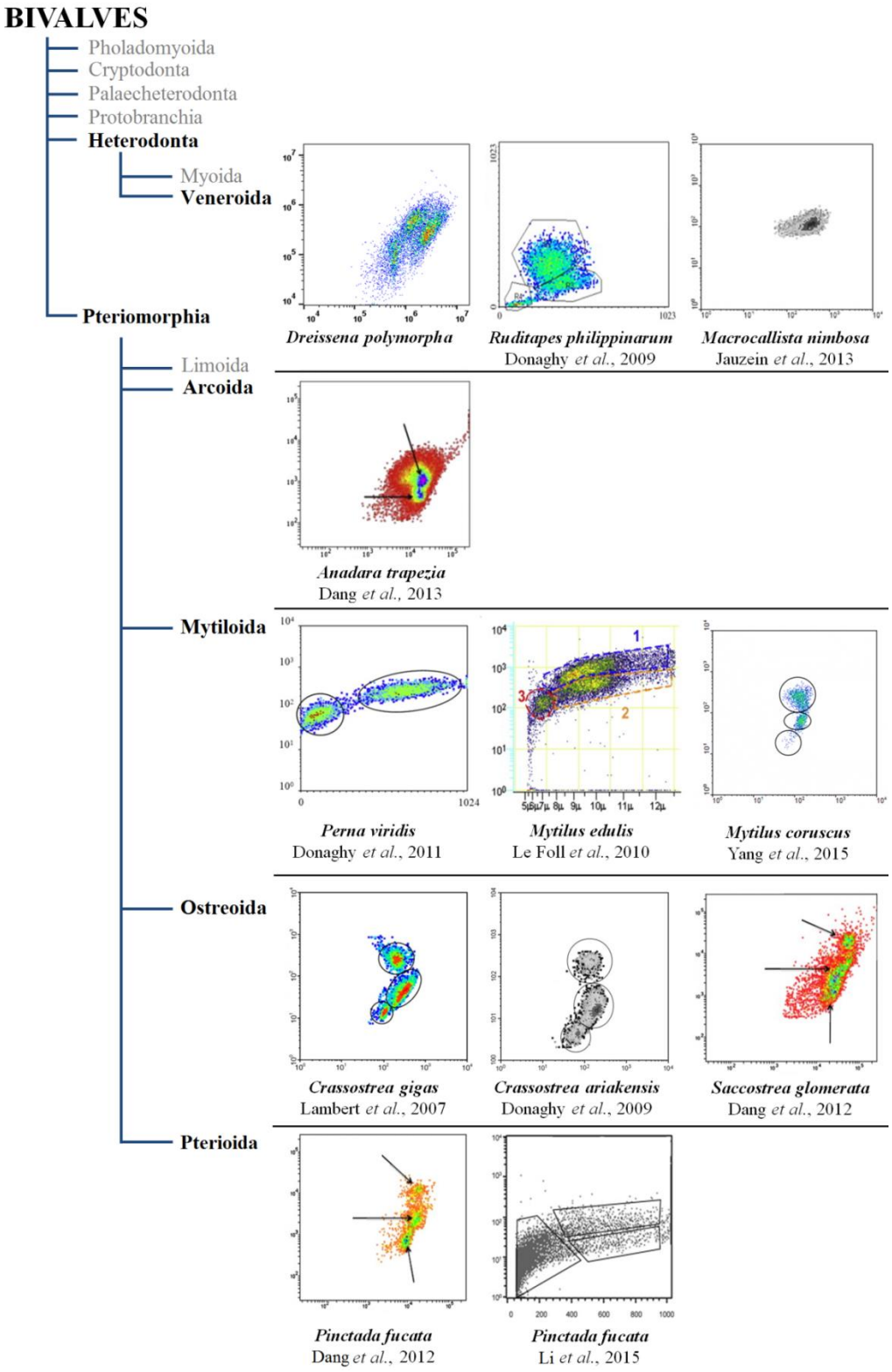


Figure 1. 7 : Illustration de la diversité de distribution des populations hémocytaires en cytométrie de flux chez différentes classes de mollusques.

II.2. Origines des cellules hémocytaires

L'absence de divisions cellulaires des hémocytes circulant chez les bivalves laisse supposer de l'existence d'au moins un site d'hématopoïèse, cependant très peu de choses sont connues chez les bivalves. Plusieurs hypothèses ont été émises à ce sujet et certains auteurs supposent l'existence d'un organe dédié à l'hématopoïèse alors que d'autres présument que les cellules proviennent de la différenciation de cellules des tissus connectifs ou provenant du tractus digestif (Cheng 1983). Chez la dreissène, Morton (1969) a suggéré que la formation des cellules hémocytaires provenait de la fragmentation des tubules digestifs (Figure 1.8). A l'heure actuelle aucune étude ne permet d'affirmer l'une de ces hypothèses et l'origine des cellules reste inconnue.

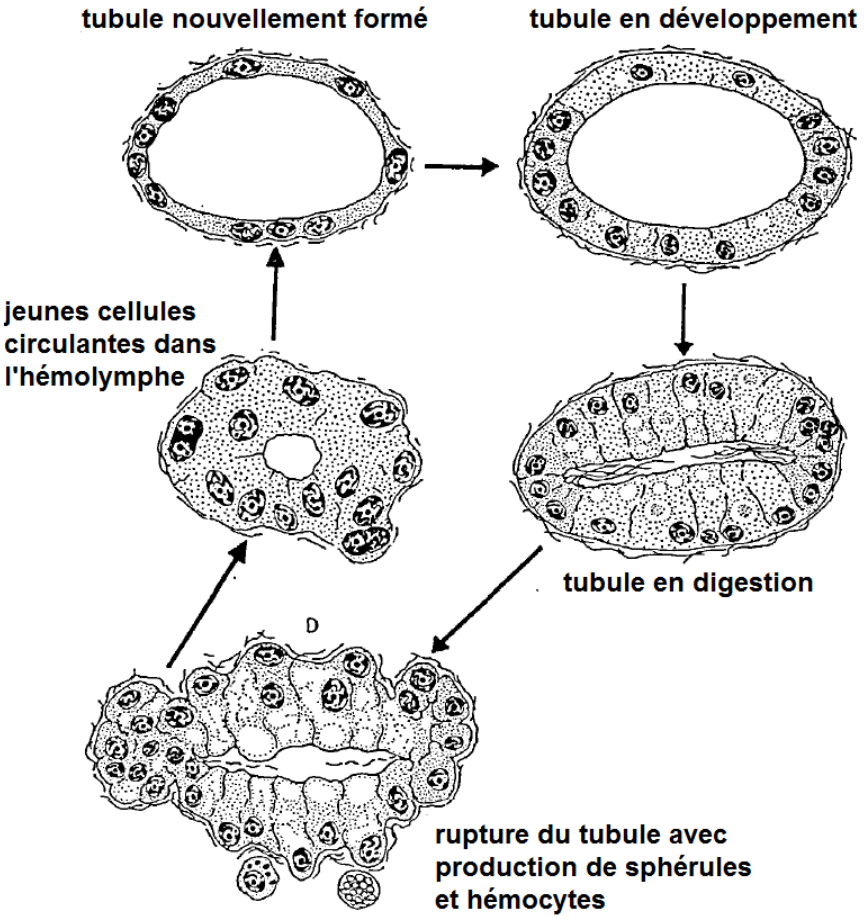


Figure 1. 8 : Représentation des différents états des tubules digestifs chez la dreissène et leur implication potentielle dans l'hématopoïèse (D'après Morton 1969b).

Il en est de même pour l'ontogenèse des cellules hémocytaires qui reste encore inconnue mais des auteurs ont émis des hypothèses visant à expliquer le cycle de vie de ces cellules. Le premier modèle décrit par Mix en 1976 propose quatre compartiments pour ce processus : La première étape correspond à une prolifération des cellules souches pour former les hyalinocytes. Lors de la seconde étape, les hyalinocytes vont maturer en hyalinocytes granulaires ou deux autres types intermédiaires. Lors de la troisième phase dite de fonctionnalisation, les hyalinocytes granuleux vont former des granulocytes basophiles et acidophiles et les cellules intermédiaires vont se différentier en fibroblastes, myoblastes et cellules pigmentaires. La dernière phase, qualifiée de « perte cellulaire » correspond à l'intervention des cellules dans les processus de défense ou leur sénescence et la diapédèse (Figure 1.9).

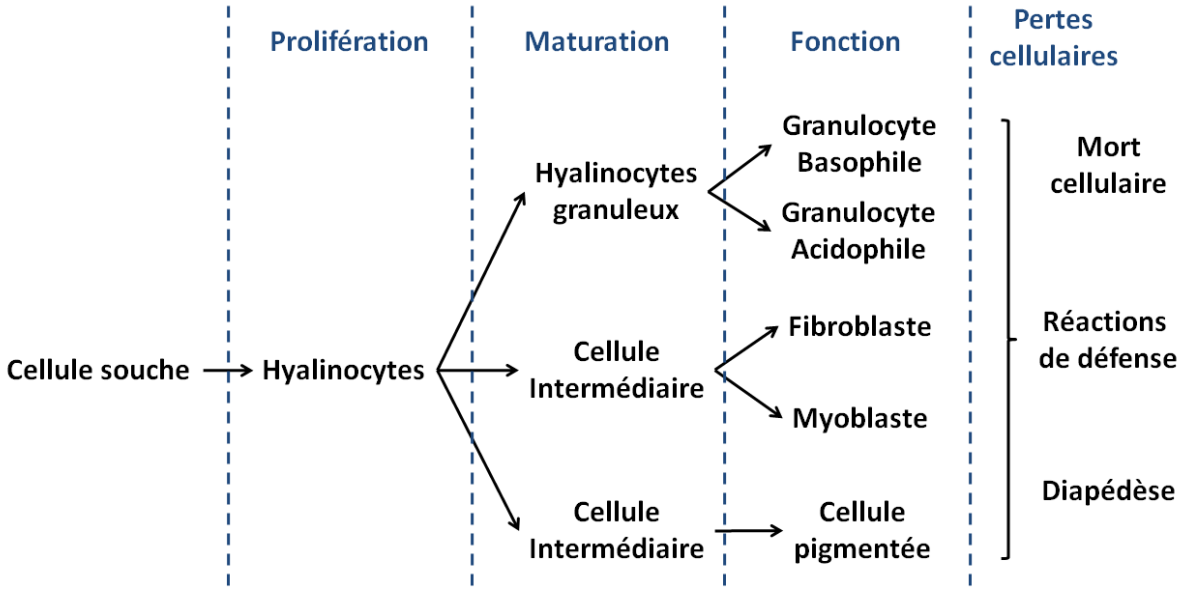


Figure 1. 9 : Modèle général d'ontogenèse chez les mollusques bivalves proposé par Mix (1976).

Un second modèle d'ontogenèse a été proposé par Moore & Lowe (1977) basé sur deux séries de développement définies par la croissance des hémocytes basophiles et celle des acidophiles. Pour la première série, les petits hémocytes basophiles sont considérés comme les stades jeunes se développant en hémocytes basophiles plus grand par un développement cytoplasmique. La seconde série concerne les cellules

granulaires dont les plus petites cellules sont les précurseurs. Il est proposé que le degré d'acidophilie des granules évolue avec la croissance de la cellule.

Cheng (1981) propose un modèle d'ontogenèse basé sur le développement des cellules à partir de trois types de cellules souches : les granuloblastes, les hyalinoblastes et les jeunes cellules séreuses qui vont se différencier en plusieurs étapes pour aboutir respectivement aux granulocytes, hyalinocytes et aux cellules séreuses (Figure 1.10).

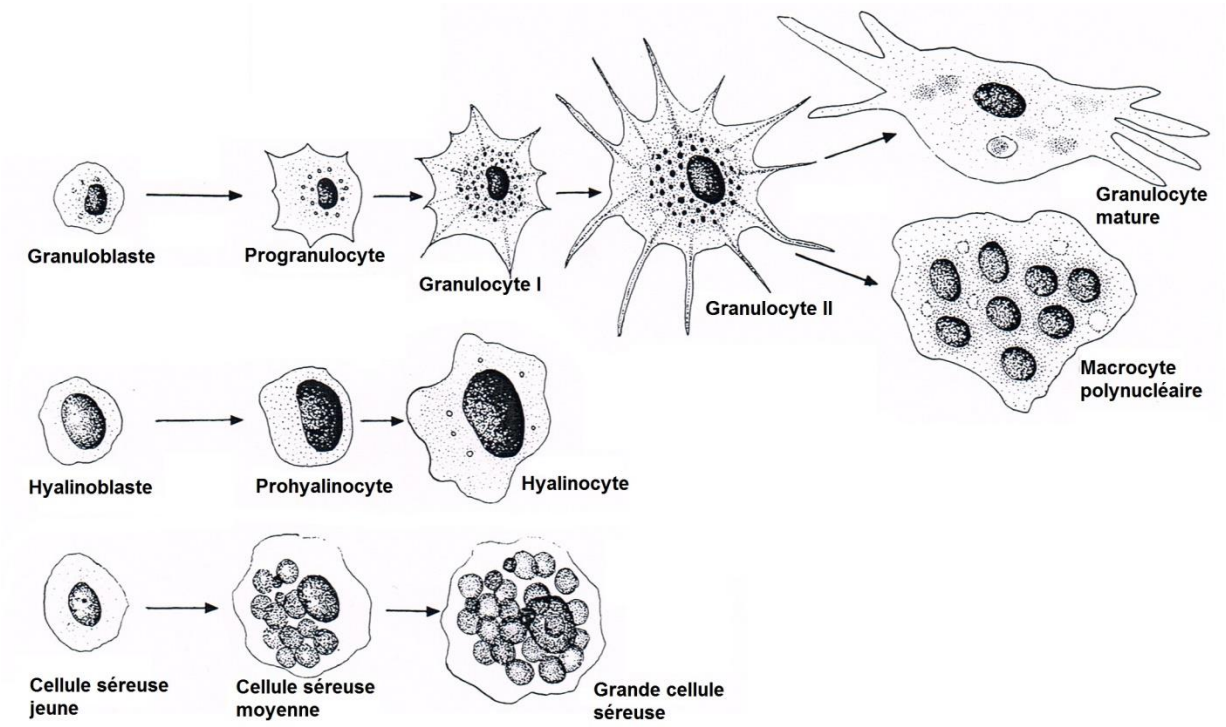


Figure 1. 10 : Modèle général d'ontogenèse chez les mollusques bivalves proposé par Cheng (1981).

Plus récemment, Rebelo (2013) propose un modèle suite à l'étude des populations hémocytaires chez l'huître *Crassostrea rhizophorae* en cytométrie de flux et microscopie électronique à transmission. Il émet l'hypothèse que les hémoblastes entrent en maturation pour former les hémocytes agranulaires. Ces hémocytes vont accumuler des granules au sein de leur cytoplasme et devenir des granulocytes. Les granulocytes redeviendraient des hémocytes agranulaires par dégranulation et formereraient un cycle entre le renouvellement et la perte des granules cytoplasmiques (Figure1.11).

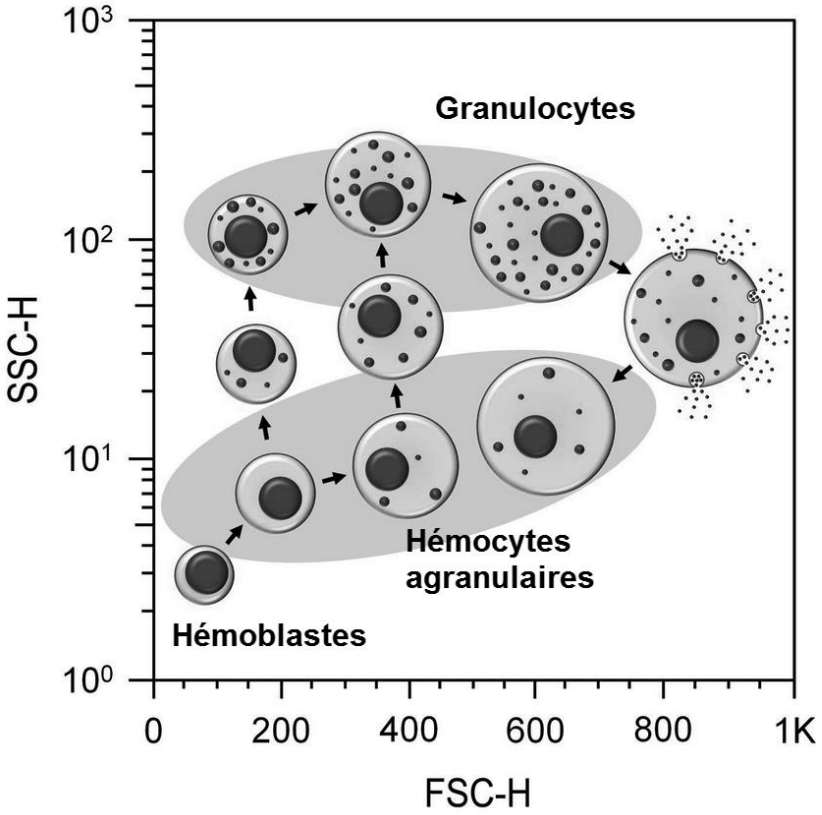


Figure 1. 11 : Modèle général d'ontogenèse chez les mollusques bivalves proposé par Rebelo *et al.*, 2013.

II.3. Réparation des blessures et de la coquille

La réparation des blessures est un processus complexe incluant une série d'évènements biologiques permettant la restauration de l'intégrité tissulaire et sa fonction (Franchini & Ottaviani 2000). Cette fonction est assurée en partie par les hémocytes et se déroule selon les étapes suivantes : Les hémocytes sont dans un premier temps recrutés sur le lieu de la blessure et vont s'infiltrer dans les tissus pour s'agréger au niveau de la blessure. Par la suite, les hémocytes vont éliminer les cellules endommagées par phagocytose avant de synthétiser du collagène afin de restructurer le tissu (Cheng 1981 ; Suzuki *et al.*, 1991, 1992 ; Franchini & Ottaviani 2000). Il a été

observé que ce processus était supporté par les hémocytes agranulaires chez l'huître Akoya *Pinctada fucata* (Suzuki *et al.*, 1991).

Le manteau des bivalves est responsable de la formation de la coquille. En cas d'altération de cette structure, des processus de réparation sont mis en place par la mobilisation de calcium depuis d'autres régions de l'organisme. Les hémocytes vont assurer le transport de calcium et de protéines en migrant jusqu'à la coquille pour déposer ces composants (Cheng 1981 ; Mount *et al.*, 2004).

II.4. Digestion et transport des nutriments

L'activité de digestion par les cellules hémocytaires est un processus qui ne constitue pas une fonction isolée du fait qu'elle ne puisse pas être différenciée des fonctions de défense (Cheng 1981). Chez les bivalves, la digestion peut être extracellulaire au niveau stomacal par l'action du stylet cristallin. La digestion peut être aussi intracellulaire, assurée par les cellules digestives et les hémocytes. Les hémocytes peuvent migrer dans le tractus digestif afin d'absorber les nutriments solubles par pinocytose et les plus grosses particules par phagocytose. Ceci a été démontré par la détection de pigments végétaux au sein des hémocytes (Feng *et al.*, 1977). Les hémocytes permettent ainsi le transport des nutriments et des lipides vers les organes pour les redistribuer (Pollero *et al.*, 1985). Chez la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus*, il a été observé un transfert des nutriments depuis le tractus digestif vers les gonades (Beninger *et al.*, 2003)

II.5. Implications dans la détoxication

Les hémocytes jouent un rôle important dans la détoxication de divers composés. Ce mécanisme est défini comme l'ensemble des processus, stratégies ou mécanismes qui permettent de minimiser le potentiel d'un xénobiotique à interagir de façon nuisible avec des macromolécules essentielles (Mason et Kenkin 1995). Au niveau de la cellule hémocytaire, on notera principalement deux stratégies.

La première vise à limiter l'accumulation des contaminants dans les membranes. Pour ce faire, les cellules hémocytaires sont équipées de systèmes enzymatiques permettant l'élimination des xénobiotiques. Ce processus se déroule en trois phases mettant en jeu différentes enzymes de biotransformation et des transporteurs. La réaction de phase 1, qualifiée de phase de fonctionnalisation permet de rendre la molécule plus polaire par ajout d'une nouvelle fonction chimique (-OH, NH_2, COOH). Cette étape est assurée par les cytochromes p450 et permet la métabolisation de nombreuses espèces chimiques. Les réactions de phase 2 ou conjugaison, permet l'ajout d'un radical hydrophile sur la molécule initiale ou issue de la fonctionnalisation en phase 1. Cette étape est assurée par l'enzyme glutathion-s-transférase (GST) qui permet généralement une diminution de la toxicité des molécules et augmente leur solubilité afin de faciliter leur transport. La troisième phase consiste en une élimination active des composés par des protéines membranaires de transport composées de protéines membranaires MXR pour « Multi-Xenobiotic Resistance » qui regroupent les protéines de la famille des *ATP binding Cassette* ou ABC transporteurs (Figure 1.12) (Bard 2000 ; Xu *et al.*, 2005). Ces activités ont été détectées chez *Dreissena polymorpha* mais aucune étude n'a été réalisée de façon spécifique sur le tissu hémolymphatique de cette espèce (Smital *et al.*, 2003 ; Pain & Parant 2007 ; Faria *et al.*, 2014 ; Châtel *et al.*, 2015). Chez la moule bleue, *M. edulis*, la protéine MXR a été démontrée comme étant plus synthétisée dans les hémocytes issus de sites fortement contaminés avec une activité supérieure pour les hémocytes granulaires comparativement aux agranulaires (Rioult *et al.*, 2014).

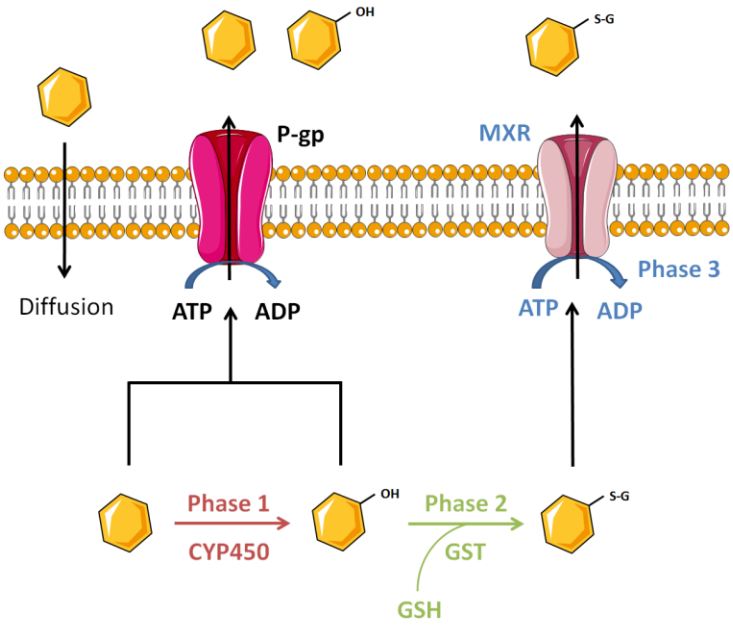


Figure 1. 12 : Schéma synthétique des mécanismes de détoxication cellulaire de phase I, II et III pouvant être induits en réponse à un xénobiotique (modifié d'après Bard 2000).

La seconde stratégie a été étudiée notamment au travers de contaminations par les métaux et consiste en une séquestration du contaminant. Après diffusion dans les cellules au niveau des branchies ou du tractus digestif, les métaux sont libérés par exocytose des vacuoles lysosomales dans le système circulatoire où ils sont pris en charge par les hémocytes circulants. Les cellules hémocytaires sont capables de synthétiser des métallothionéines (MT) en réponse à une contamination par les éléments traces métalliques. Ces protéines de faible masse moléculaire sont riches en cystéines et possèdent une forte affinité pour les métaux essentiels mais également pour les métaux lourds. Les complexes formés (MT-métal) vont pouvoir être séquestrés dans les lysosomes. Chez la dreissène, la présence de plomb a été détectée au sein des hémocytes au niveau des granules des granulocytes (Giambérini *et al.*, 1996). L'élimination des métaux se fera par voie rénale au niveau de la glande péricardique via un processus d'ultrafiltration (Herwig *et al.*, 1989 ; Giambérini & Pihan 1996 ; Deb & Fukushima 1999 ; Marigómez *et al.*, 2002).

II.6. Mécanismes de défense chez les bivalves

L'intérêt porté à l'étude du système immunitaire des invertébrés est grandissant afin de mieux comprendre la physiologie de ces espèces qui constituent 95% du règne animal. Les raisons pouvant être d'améliorer leur contrôle, de protéger les populations et les ressources dans le cas d'espèces vectrices de maladies ou invasives ravageuses de cultures, mais également d'améliorer l'élevage d'espèces d'intérêt économique. Les mollusques constituent un des phylums les plus diversifiés du règne animal. Au sein de ce phylum, les bivalves regroupent environ 7500 espèces, ce qui en fait la seconde classe la plus diversifié des mollusques après les gastéropodes. Au cours de l'évolution, les bivalves ont développé un large champ de stratégies permettant de les protéger des attaques de pathogènes virulents.

La survie des organismes dépend de leur capacité à reconnaître et éliminer de façon efficace les agents infectieux tels que les bactéries, les parasites, les virus etc. Chez les bivalves, les barrières anatomiques et chimiques telles que la coquille ou le mucus constituent la première ligne de défense physique face aux pathogènes. Si ces barrières sont franchies, des mécanismes de défenses biologiques interviennent. Comme pour tous les invertébrés, leurs défenses immunitaires internes reposent principalement sur des réponses innées et ne possèdent pas de réponse adaptative contrairement aux vertébrés pourvus de lymphocytes B producteurs d'anticorps. La réponse immunitaire innée est exécutée au travers de réponses humorales, *via* la production de molécules effectrices solubles regroupant les enzymes lysosomales, les peptides antimicrobiens, les inhibiteurs de protéases, les lectines et sont impliqués dans la neutralisation des pathogènes. Le second type de réponse immunitaire innée est la réponse à médiation cellulaire au travers de mécanismes tels que l'encapsulation ou la phagocytose assurées par les hémocytes et qui vont permettre la digestion et l'élimination des particules étrangères.

II.7. Mécanismes à médiation humorale

II.7.1. Les enzymes lysosomales : le lysozyme

Après ingestion d'une particule étrangère, les enzymes lysosomales sont déversées dans le phagosome pour le détruire mais elles peuvent également être libérées dans l'hémolymphe par exocytose (Smith 2001). La plus connue est le lysozyme qui joue un rôle dans la défense et la digestion chez les mollusques (McHenery 1979 ; Xue *et al.*, 2010). Cette enzyme agit par hydrolyse de la liaison *β*-1,4-glycosidique entre les résidus N-acétylglucosamine et N-acétylmuramique des peptidoglycanes composant la paroi cellulaire des bactéries. Chez les mollusques, on retrouve le lysozyme de la famille de type i (pour « invertebrate ») qui est efficace sur les bactéries à Gram positif et négatif (Xue *et al.*, 2004).

II.7.2. Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont retrouvés chez les plantes et les animaux et sont des effecteurs clefs de la réponse humorale. Ils regroupent plus de 1000 peptides parmi lesquels une cinquantaine ont été isolés chez les mollusques, majoritairement chez les bivalves (Li *et al.*, 2009 ; 2011). Ils sont classés dans 4 groupes selon les caractéristiques de leur structure primaire : les MGD ou défensines, les mytilines, les myticines et les mytimycines. Leur caractère amphipathique permet leur insertion dans les membranes des pathogènes pour y former des pores entraînant une déstabilisation de la membrane. Un peptide de la famille des défensines a été détecté dans de nombreux tissus chez la dreissène et également dans les hémocytes (Bulet *et al.*, 2004 ; Xu & Faisal 2010).

II.7.3. Les inhibiteurs de protéase

Les pathogènes utilisent des protéases afin de faciliter l'infection de leur hôte. Ces protéases vont permettre de réduire l'activité du lysozyme et l'agglutination des hémocytes (La Peyre *et al.*, 1996). Les inhibiteurs de protéase sont présents dans

toutes les formes de vie, du virus à l'humain. Chez les mollusques, ils participent aux défenses immunitaires par inactivation des protéases des pathogènes et permettent ainsi une réduction de leur virulence et d'éviter les atteintes tissulaires de l'hôte (Faisal *et al.*, 1998 ; Xue *et al.*, 2006).

II.7.4. Les lectines

Les lectines sont des protéines de reconnaissance des glucides pouvant se lier à des structures lipidiques spécifiques endogènes à l'hôte ou présentés par un microorganisme (Wang *et al.*, 2011). L'intégralité de leurs fonctions n'a pas été clarifiée chez les mollusques mais elles sont considérées comme jouant un rôle important dans la reconnaissance du non soi et dans les défenses contre les pathogènes. Ces protéines possèdent une grande affinité pour différents motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) tels que les lipopolysaccharides (LPS) ou les peptidoglycanes (PGN) permettant la reconnaissance des pathogènes. Ces protéines lient les glucides membranaires des pathogènes afin de les immobiliser et les agglutiner. Elles sont reconnues par les hémocytes et vont faciliter leur attachement avec le pathogène et activer la phagocytose (Kim *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007). Un rôle similaire a été attribué aux protéines apparentées au fibrinogène (FREPs) chez les mollusques (Hanington & Zhang 2011). Les lectines et les FREPs possèdent donc un rôle opsonique intervenant en amont de la réponse à médiation cellulaire.

II.8. Mécanismes de « défenses » cellulaires

II.8.1 La phagocytose

La phagocytose est un mécanisme de défense retrouvé dans tout le règne animal dont le rôle est d'éliminer une particule étrangère généralement pathogène. Ce processus se déroule en quatre étapes incluant : L'attraction vers la cible, la reconnaissance et l'attachement de la cellule effectrice à la cible, l'internalisation puis la destruction des particules étrangères. Il a été démontré chez les bivalves que les hémocytes sont

capables de phagocyter différentes particules incluant des bactéries, des algues, des levures, des cellules sanguines et des billes de latex (Wootton *et al*., 2003).

Suite à une infection, la rencontre entre les hémocytes et les particules étrangères peut se produire passivement ou activement par chimiotactisme. Les hémocytes possèdent un chimiotactisme pour les produits libérés par les agents infectieux et bactéries ou pour les cytokines libérées par les cellules de l'hôte sur le site d'infection. Ces phénomènes chimiotactiques induits par des souches *Vibrio sp.*, *E.coli*, des LPS ou interleukines ont été observés diverses espèces telles que *Ruditapes decussatus*, *Mercenaria mercenaria* et *Mytilus sp.* (Schneeweiss & Renwrantz 1993 ; Fawcett & Tripp 1994 ; Lopez-Cortes *et al.*, 1999 ; Ottaviani *et al.*, 2000). Ces signaux ont pour conséquence le recrutement d'hémocytes qui vont s'infiltrer sur les lieux de l'infection pour limiter la propagation et éliminer les pathogènes (inflammation locale) (Figure 1.13).

Figure 1. 13 : Observation histologique d'une infection par le parasite *Perkinsus* sp. chez *Ruditapes philippinarum* montrant une infiltration massive d'hémocytes dans les tissus du manteau (tiré de Donaghy *et al.*, 2009b).

La reconnaissance des particules étrangères peut se faire selon deux modalités. La première, qualifiée de non opsonique consiste en l'interaction directe entre des récepteurs hémocytaires de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs) pouvant se lier à des PAMPs variés (LPS, PGN, TLR…) présents sur les cellules cibles. Le second, qualifié de reconnaissance opsonique fait intervenir des récepteurs pouvant lier les protéines opsoniques telles que les lectines liées à des PAMPs (Song *et al*., 2010). L'attachement entre l'hémocyte et la particule étrangère se fait au travers d'interactions entre les récepteurs et ligands (PRR avec PAMP) mais fait également intervenir des intégrines qui sont des protéines transmembranaires de liaison (Johansson 1999 ; Terahara *et al.*, 2006). Dès que l'attachement entre les deux corps cellulaire est établi, l'internalisation de la particule étrangère est initiée (Figure 1.14). Cette étape met en jeu des phénomènes de remaniement cytosquelettiques. La polymérisation des filaments d'actine permet l'émission de pseudopodes qui vont englober la particule avant de l'internaliser dans le cytoplasme par invagination de la membrane pour former une vésicule d'endocytose ou phagosome primaire. Le phagosome fusionne ensuite avec les lysosomes pour former le phagosome secondaire ou phagolysosome dans lequel aura lieu la dégradation de la particule (Figure 1.14).

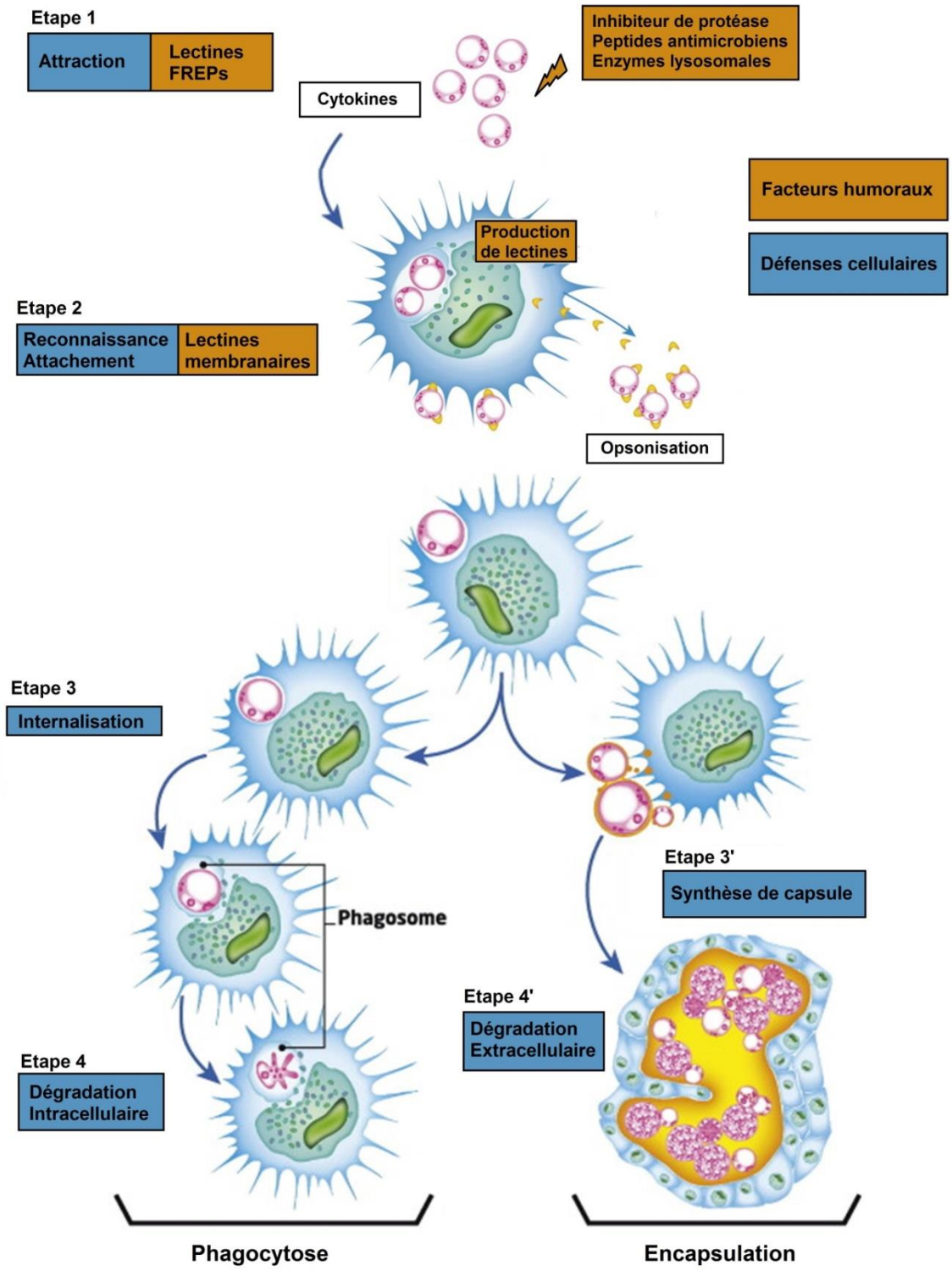


Figure 1. 14 : Présentation des mécanismes humoraux et cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire innée chez les bivalves. Modifié d'après Soudant *et al.*, 2013.

La dégradation des particules étrangères au sein du phagolysosome est assurée par deux mécanismes, le premier faisant intervenir les enzymes lysosomales et le second des espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS en anglais) (Figure 1.15).

Le premier mécanisme de dégradation implique les enzymes lysosomales déversées dans le phagosome au moment de la fusion entre les deux organites. Les principales enzymes lysosomales chez les invertébrés sont les phosphatases acides ou alcalines, la *β*-glucoronidase, les estérases et les protéases. Afin d'assurer le fonctionnement optimal des enzymes, l'organite possède un pH acide qui est maintenu par des pompes à protons membranaires (Pipe 1990 ; Lowe & Fossato 2000 ; Smith 2001). Chez *Dreissena polymorpha*, la présence d'enzymes hydrolytiques telles que des acides phosphatases, des estérases et la *β*-glucoronidase a été détectée au sein des cellules hémocytaires (Giambérini *et al.*, 1996).

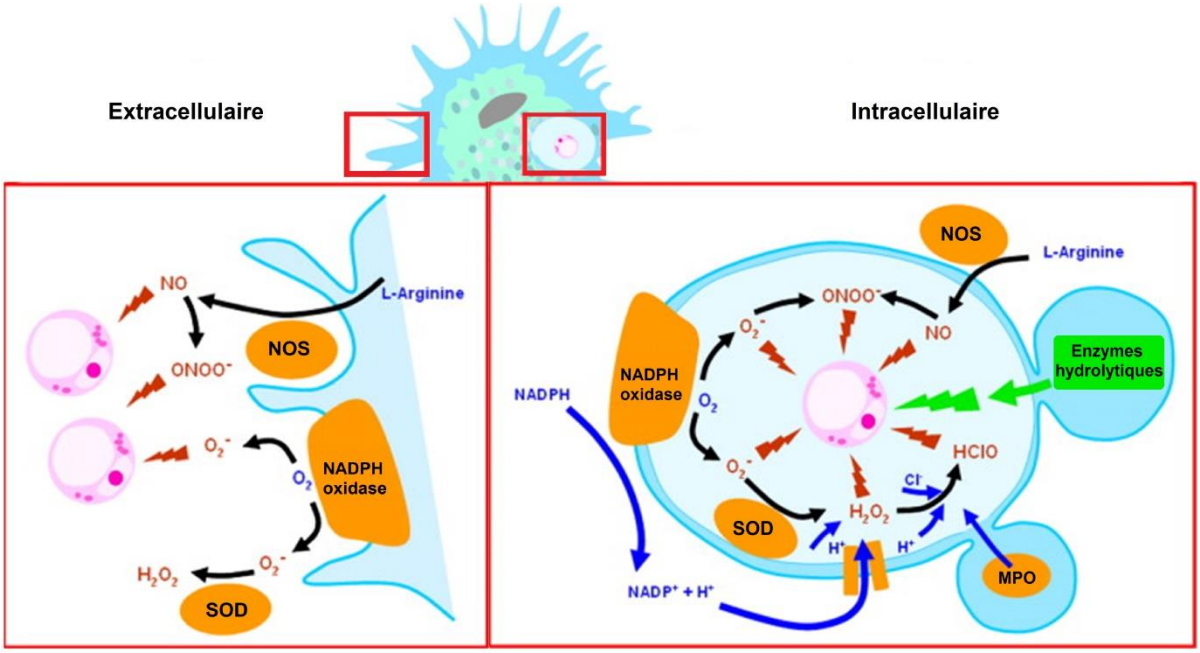


Figure 1. 15 : Processus d'élimination des particules étrangères par les hémocytes phagocytaires. Les enzymes productrices de ROS sont représentées en orange et les espèces cytotoxiques en rouge. NO : oxide nitrique, $ONOO^-$: péroxynitrite, $O2^-$: superoxide, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, HClO : acide hypochloreux, NOS : oxide nitrique synthase, SOD : superoxide dismutase, MPO : myeloperoxidase. (D'après Donaghy *et al.*, 2009b)

Le second mécanisme fait intervenir des espèces réactives de l'oxygène qui sont des espèces chimiques oxygénées très réactives à action cytotoxique regroupant les radicaux libres et les espèces non radicalaires. Ces molécules sont retrouvées chez les vertébrés comme étant impliquées dans les défenses internes (Dröge 2002). La production d'EROs est décrite par une cascade de réactions initiées par la production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) par la NADPH oxydase (NOX). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut alors se former spontanément ou en étant catalysé par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). Ce composé peut ensuite être converti en présence d'ions métalliques réduits en radical hydroxyl ($OH^{\cdot}$) très réactif par la réaction de Fenton ou être catalysé en présence d'ions chlorures par la myéloperoxidase (MPO) en acide hypochloreux (HClO) très toxique (Figure 1.15). Ces espèces produites peuvent également être toxiques pour la cellule hôte mais cette toxicité est régulée par des systèmes antioxydants permettant le maintien d'un équilibre entre la production d'EROs et leur élimination. La SOD permet la dismutation des ions O^{2-} en H_2O_2. La catalase et la glutathion péroxidase (GPx) réduisent l'H_2O_2 en H_2O (Figure 1.15) (Torreilles *et al.*, 1996 ; Anderson 2001 ; Donaghy *et al.,* 2009b).

Les hémocytes sont également capables de produire des espèces réactives de l'azote (RNS) dont la production est initiée par l'oxyde nitrique synthase (NOS) conduisant à la production d'oxyde nitrique (NO), pouvant être converti en divers RNS dont l'ion peroxynitrite ($ONOO^-$) par réaction avec l'anion superoxyde (Figure 1.15) (Gourdon *et al.*, 2001 ; Donaghy *et al.,* 2009b ; Soudan *et al.,* 2013).

Sous certaines conditions, il est possible qu'un déséquilibre en faveur d'une surproduction d'EROs soit créé au sein de la cellule, qualifié de « stress oxydant », ce phénomène peut entraîner des dommages cellulaires, déstabiliser les membranes lysosomales et déclencher l'activation des voies de l'apoptose (Lowe & Fossato 2000 ; Sokolova 2009 ; Kiss 2010).

A l'issue du processus de dégradation des particules, les produits de dégradation peuvent être accumulés dans des vacuoles glycogéniques ou libérées dans le milieu extracellulaire générant également une décharge d'enzymes lysosomales dans l'hémolymphe (Carballal *et al.*, 1997).

II.8.2. L'encapsulation

Lorsqu'une particule est trop volumineuse pour être phagocytée ou afin de piéger un grand nombre de bactéries, le processus d'encapsulation est mis en place (Figure 1.14). La reconnaissance et l'adhésion au pathogène se déroulent de la même façon que pour la phagocytose décrite précédemment. Cependant, les hémocytes vont se différencier en cellules de type fibroblastique et s'organisent en couches concentriques pour former une fine capsule autour de la particule pour procéder à son élimination (Fisher 1986). La mise en place de ce mécanisme a été observée chez la moule zébrée lors d'une infection par le parasite *Aspidogasper sp.* (Laruelle *et al.*, 2002).

III. Facteurs influençant les fonctions hémocytaires chez les bivalves

Du fait qu'ils soient poikilothermes et osmoconformes, les mollusques ne possèdent pas de système de régulations et sont par conséquent soumis en permanence à des conditions environnementales pouvant être instables et fortement variables dépendamment du climat ou de la présence de polluants. Le système circulatoire des bivalves étant semi-ouvert, les cellules hémocytaires sont exposées constamment aux variations de milieu. De nombreux travaux ont montré des modulations de la composante immunitaire chez les bivalves selon les conditions environnementales. Ces modulations ne sont pas seulement saisonnières mais dépendantes de l'état physiologique des individus et de la qualité de leur habitat. Le système immunitaire est donc fortement influencé par des facteurs intrinsèques (reproduction) et extrinsèques (physico-chimie) qui peuvent affecter l'immunité de façon directe, en modifiant les composantes de la réponse immunitaire ou indirectement, en induisant une réponse de stress (Mydlarz *et al.*, 2006 ; Girón-Pérez 2010).

III.1. Les agents infectieux

Les mécanismes immunitaires présentés précédemment ont pour fonction la destruction d'agents infectieux grâce aux actions combinées des réponses humorales et cellulaires.

Cependant, certains agents biologiques tels que les bactéries, les virus et certains protozoaires possèdent des stratégies permettant d'éviter l'action des systèmes de défense. Une infection forte peut entraîner des mortalités massives de certaines espèces. C'est le cas notamment des infections par le protiste *Perkinsus spp*. qui provoquent des mortalités massives des populations de palourdes et d'huîtres (Soudant *et al.*, 2013). Ils sont connus pour avoir des effets sub-létaux sur les individus au niveau immunitaire en occasionnant une augmentation des concentrations hémocytaires, une diminution de la phagocytose ou encore des modulations de l'activité lysozyme (Goedken *et al.*, 2005 ; Fly-Sainte-Marie *et al.*, 2009 ; Roberts *et al.*, 2012). Pathogène reconnu pour plusieurs espèces de bivalves marins, les bactéries du genre *Vibrio* sont responsables de pathologies importantes comme la maladie de l'anneau brun qui touche les palourdes. Suite à l'exposition des bivalves à ces bactéries est observée une augmentation des concentrations en hémocytes circulants associée à une augmentation de mortalité hémocytaire ainsi qu'une augmentation de l'activité lysozyme et une diminution de l'activité de phagocytose (Allam *et al.*, 2000 ; Allam & Ford 2006). Chez *Mytilus edulis*, certaines souches de *Vibrio* ont pour effets d'augmenter le taux de mortalité hémocytaire, d'altérer la motilité des hémocytes et induisent une inhibition de phagocytose et de production de ROS (Ben Cheikh *et al.*, 2016). L'infection de l'huître plate *Ostrea edulis* par le protiste *Bonamia* sp. a été associée à une augmentation des infiltrations tissulaires par les hémocytes (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003).

Chez la dreissène, une trentaine de parasites sont reconnus dont la bactérie *Pseudomonas fluorescens* qui possède une pathogénicité très importante chez la moule zébrée. La souche CL 145A de cette bactérie est utilisée comme biocides afin d'éliminer les moules de certains écosystèmes (Meehan *et al.*, 2014). Il n'existe cependant aucune étude concernant leurs influences sur le système immunitaire de leur hôte (Molloy *et al.*, 1997, 2013a, 2013b ; Minguez *et al.*, 2013).

III.2. Température et pH

Un stress de température par réchauffement ou refroidissement peu compromettre les fonctions hémocytaires chez les bivalves. D'après la littérature, un effet notable d'un stress par élévation de température consiste en une modulation des paramètres hémolymphatiques. Il a été décrit une augmentation de concentration hémocytaire chez plusieurs espèces comme *Ruditapes phillipinarum*, *Chamelea gallina*, *Chlamys farreri* ou *Mercenaria mercenaria* (Paillard *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2007 ; Monari *et al.*, 2007 ; Perrigault *et al.*, 2011). Cependant, des effets opposés ont été observés sous certaines conditions de salinité et de pH lors d'une étude comparative entre *Mytilus galloprovincialis* et *Chamalea gallina* (Matozzo *et al.*, 2012). Chez *Crassostrea virginica*, des modifications de la structure des populations hémocytaires se traduisant par une augmentation du taux de granulocytes ont été observées en parallèle d'une augmentation de la concentration cellulaire lors d'une élévation de température (Chu & La Peyre 1993). Il a été suggéré que ce type de réponse soit lié à une mobilisation des hémocytes depuis les tissus vers l'hémolymphe pour répondre à un développement bactérien plus important quand la température est plus élevée (Monari *et al.*, 2007).

Outre des effets sur les paramètres hémolymphatiques, des modifications de température peuvent entraîner des perturbations de fonctionnalités cellulaires. Une diminution de l'activité de phagocytose *in vitro* a été observée à une température de 10°C chez *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997). Une augmentation de l'efficacité de cette fonction a été mesurée entre 20 et 25°C pour les hémocytes de la palourde *Ruditapes philippinarum* (Cima *et al.*, 2000 ; Allam *et al.*, 2002b). Chez *Crassostrea virginica*, il a été déterminé lors d'études *in vivo* qu'une augmentation de température au-delà de 20°C entraînait une diminution de l'activité phagocytaire des hémocytes (Chu et La Peyre 1993 ; Hégaret *et al.*, 2003). Dans le cadre d'expérimentations *in vitro* chez la même espèce, il a été défini que la phagocytose était réduite pour des températures inférieures à 8°C et supérieures à 37°C (Alvarez *et al.*, 1989). De la même façon pour *Crassostrea gigas*, l'activité de phagocytose est réduite à 21°C comparativement à 12°C *in vivo* alors que *in vitro*, le facteur température n'induisait pas d'effet sur cette fonction excepté à une température extrême de 60°C

(Gagnaire *et al.*, 2006 ; Malham *et al.*, 2009). Chez *Chlamys farreri*, un taux de phagocytose supérieur a été observé à 21°C comparé à 13°C et 27°C après un maintien des individus durant plusieurs mois à ces températures (Chen *et al.*, 2007). Pour les populations de moules vertes *Perna viridis* échantillonnées en Californie, l'exposition des hémocytes à une faible température générait un stress se traduisant par une baisse de phagocytose et une augmentation du métabolisme oxydatif (Donaghy *et al.*, 2011).
La phagocytose n'est pas la seule fonction affectée par ce facteur. La température a également pour conséquence de moduler la capacité d'agrégation des hémocytes (Chen & Bayne 1995 ; Auffret & Oubella 1997), la stabilité des membranes lysosomales (Hauton et al., 1998 ; Yu *et al.*, 2009), l'activité mitochondriale, la production de ROS (Abele *et al.*, 2002 ; Heise 2003 ; Donaghy *et al.*, 2011 ; Perrigault *et al.*, 2011) mais agit aussi sur les composantes humorales comme l'activité lysozyme (Monari *et al.*, 2007 ; Yu *et al.*, 2009 ; Matozzo *et al*., 2012).

Les effets d'une modification de pH sur les paramètres immunitaires, contrairement à la température, ont été relativement peu étudiés. Il a été montré chez *Mytilus edulis* une diminution de la capacité de phagocytose de particules de zymosan et une augmentation du métabolisme oxydatif dans des conditions d'acidification ainsi que des changements de prévalence de certains pathogènes (Bibby *et al.*, 2008 ; Mackenzie *et al.*, 2014). Malagoni & Ottaviani (2005) ont mis en évidence une diminution de l'activité cytotoxique des hémocytes de *Mytilus galloprovincialis* dans le cas d'une acidification de 0,7 unités pH. Une seconde étude réalisée chez la même espèce indique que l'acidification entraîne une modulation des paramètres structuraux et fonctionnels hémocytaires (Matozzo *et al.*, 2012).

Il apparaît que l'acidification du milieu est un paramètre qui affecte la croissance coquillère des mollusques (Gazeau *et al.*, 2007 ; Kurihara *et al.,* 2007). Etant donné l'implication des cellules hémocytaires dans le dépôt de carbonate de calcium au niveau de la coquille, il a été suggéré qu'une mobilisation des hémocytes dans ces processus entraînerait une diminution d'efficacité du système immunitaire (Mount *et al.*, 2004 ; Matozzo & Marin 2011).

Ces résultats démontrent des effets modulateurs des paramètres physico-chimiques sur la composante immunitaire des bivalves lorsque les conditions sont en dehors de la gamme de tolérance de chaque espèce.

III.3. Variations saisonnières

Les données concernant l'étude des variations saisonnières des paramètres immunitaires chez les bivalves proviennent d'expérimentations effectuées à partir de prélèvements réguliers sur le terrain d'individus à différents stades de gamétogenèse.

Chez *Ruditapes philippinarum*, les concentrations en hémocytes et les taux de granulocytes sont plus forts l'été en période de reproduction à des températures plus élevées (Flye-Sainte-Marie *et al.*, 2009). Il a été observé chez *Mytilus galloprovincialis* des changements de paramètres hémolymphatiques et fonctionnels au cours de l'année se traduisant par une concentration hémocytaire plus forte ainsi qu'une meilleure capacité d'élimination de bactéries *E.coli* en été (Carballal *et al.*, 1998 ; Canesi *et al.*, 2002). La mesure de l'activité lysozyme lors de deux études décrit des résultats contradictoires chez cette même espèce, l'une indiquant une activité lysozyme plus forte en été et l'autre en hiver. Ces résultats peuvent être associés à des causes environnementales différentes, notamment concernant la présence de pathogènes (Santarém *et al.*, 1994 ; Ciacci *et al.*, 2009). Pour *Mytilus edulis* et *M. trossulus*, des variations saisonnières des paramètres hémocytaires en lien avec le statut reproducteur ont été observées avec un effet marqué d'une baisse de phagocytose au moment de la ponte (Cartier *et al.*, 2004). Chez *Crassostrea gigas*, plusieurs paramètres présentent un schéma de variation saisonnier comme la concentration hémocytaire, la viabilité hémocytaire et l'activité de phagocytose (Duchemin *et al.*, 2007). Une baisse de stabilité des membranes lysosomales hémocytaires a également été mesurée lors de la ponte (Cho & Jeong 2005).

Les changements de saisons sont marqués par des évolutions de température qui est le facteur conditionnant la vitesse du cycle de gamétogenèse chez les bivalves. L'étude

des réponses physiologiques et hémocytaires sont donc indissociables des fluctuations de facteurs physico-chimiques de l'eau relatifs à la saison de prélèvement, ce qui rend difficile les interprétations de résultats et la mesure du poids de chaque paramètre dans la réponse observée.

III.4. La pollution chimique

Un grand nombre de polluants pouvant altérer la qualité de l'hémolymphe sont retrouvés dans les écosystèmes aquatiques de par les rejets liés aux activités humaines. De nombreuses études réalisées sur diverses classes de contaminants comme les éléments traces métalliques (ETMs), HAP, PCB, pesticides, résidus pharmaceutiques, nanoparticules ont révélés qu'ils exerçaient des effets néfastes sur les paramètres immunitaires des mollusques au travers d'expérimentations *in vitro*, *in vivo* ou *in situ* sur des sites contaminés. Les données acquises sur ces effets immunotoxiques chez les mollusques ont fait l'objet de plusieurs revues de littérature (Galloway & Depledge 2001 ; Girón-Pérez 2010 ; Renault 2015). De façon générale, les effets engendrés se traduisent par l'induction d'un stress lié à une production excessive de ROS et une immunodépression (Figure1.16).

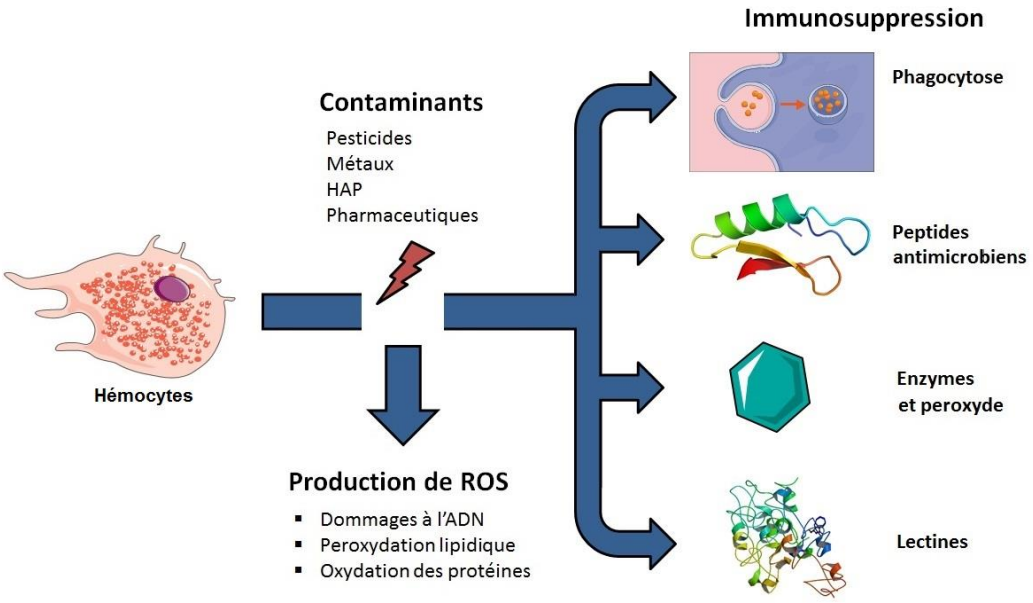


Figure 1. 16 : Effets des contaminants présents dans les écosystèmes aquatiques sur le système immunitaire des mollusques (modifié d'après Girón-Pérez 2010).

IV. Intérêts du modèle expérimental (la moule et ses hémocytes) pour une utilisation en surveillance environnementale

IV.1. Intérêt de l'organisme

La moule zébrée *Dreissena polymorpha* possède des caractéristiques qui font d'elle une espèce intéressante en surveillance environnementale. Elle présente une large répartition, est disponible toute l'année, abondante, facile à échantillonner et se maintient facilement en laboratoire. D'un point de vue physiologique, c'est une espèce sessile qui possède de fortes capacités de filtration ce qui permet une absorption rapide des contaminants et en fait une espèce sentinelle de choix. L'espèce a été très largement utilisée en biosurveillance passive *via* la mesure de contamination accumulée dans les tissus mais aussi l'analyse de biomarqueurs (De Lafontaine *et al.*, 2000 ; Camusso *et al.*, 2001 ; Graczyk *et al.*, 2003 ; Kwan *et al.*, 2003 ; Binelli *et al.*, 2005 ; Minier *et al.*, 2006 ; Riva *et al.*, 2008 ; Contardo-Jara *et al.*, 2009 ; Voets *et al.*, 2009 ; Parolini *et al.*, 2013 ; Faria *et al.*, 2014). De façon similaire, les dreissénidés sont également utilisés en biosurveillance active (Bervoest *et al.*, 2004 ; Guerlet *et al.*, 2007 ; Bourgeault *et al.*, 2010 ; Guerlet *et al.*, 2010 ; Palais *et al.*, 2011). De par son caractère invasif, l'utilisation de cette stratégie sera limitée uniquement aux écosystèmes où sa présence est avérée. Au travers de son programme « Mussel Watch », l'agence américaine d'observation océanique et atmosphérique (NOAA) a initié en 1992 la surveillance des Grands Lacs en mesurant la contamination chimique contenue dans les moules zébrées (O'Connor 2002).

Les études en conditions contrôlées ont également permis de mesurer l'impact de diverses classes de contaminants comme les métaux, HAP, PBDE ou pharmaceutiques sur la physiologie de l'espèce (Giambérini & Cajaraville 2005 ; Le Goff *et al.*, 2006 ; Binelli *et al.*, 2008 ; Quinn *et al.*, 2011 ; Parolini *et al.*, 2011a ; Parolini & Binelli 2012). Sur le terrain ou en laboratoire, les marqueurs de génotoxicité et de détoxication ont été les plus étudiés. La moule zébrée a récemment été qualifiée comme étant l'équivalent en eau douce de la moule bleue pour les milieux marins pour les études écotoxicologiques (Binelli *et al.*, 2015).

La biologie et l'écologie de l'espèce ont été très largement étudiées depuis quelques décennies. Entre 1989 et 2011, un total de 1502 publications a été référencé et 206 thèses concernant l'espèce sont parues (Schloesser & Schmuckal 2012). L'ensemble de ces données constitue une source d'informations indispensables permettant d'améliorer la compréhension des processus physiologiques mis en jeu lors d'études sur le terrain dans de multiples contextes.

IV.2 L'hémocyte de la dreissène comme support d'une approche multimarqueurs en écotoxicologie

Les cellules hémocytaires peuvent servir de base à l'estimation du niveau d'immunocompétence de l'organisme. Certains paramètres hémocytaires peuvent indiquer si les composants du système immunitaire (nombre et types d'hémocytes) sont structurellement capables d'accomplir de façon efficace des fonctions immunitaires (phagocytose, activité oxydative) (Auffret, 2005). Ces descripteurs cellulaires peuvent être mesurés à partir d'échantillons d'hémolymphe facilement prélevables de façon non létale et peuvent permettre de déterminer l'état de santé des individus.

L'utilisation chez cette espèce de ce type cellulaire particulier constitue un support de choix pour les études écotoxicologiques de par leurs implications décrites précédemment dans la physiologie des mollusques. En effet, une altération des fonctions hémocytaires peut résulter en une atteinte des différentes grandes fonctions physiologiques des individus et avoir des répercussions à l'échelle populationnelle.

Chapitre 2: Bases méthodologiques

Ce chapitre du mémoire est divisé en deux parties dont la première vise à donner les bases théoriques de la cytométrie de flux, technique largement utilisée en immunologie des vertébrés et qui s'est développée pour l'étude des composantes cellulaires de l'immunité des invertébrés. Une grande partie des travaux présentés dans ce manuscrit sont basés sur l'utilisation de cette technique qui permet d'étudier les paramètres physiques et fonctionnels cellulaires.

La seconde partie est consacrée au développement des méthodologies cytométriques permettant la mesure des marqueurs de fonctionnalités hémocytaires chez la moule zébrée. Cette partie présente les arguments concernant les choix de certains points méthodologiques ainsi que les résultats d'expérimentations qui ont permis d'aboutir aux protocoles utilisés pour l'intégralité des travaux.

I. La cytométrie en flux

La cytométrie en flux ou CMF est une technique permettant l'analyse multiparamétrique qualitative et quantitative d'un échantillon contenant des particules en suspension dans un flux liquide. L'instrument illumine des particules qui passent individuellement devant une source lumineuse, généralement monochromatique, puis détecte et met en corrélation le signal réémis par les cellules illuminées (Givan, 2004). Le flux liquide permet d'aligner les cellules les unes derrières les autres et facilite ainsi la distinction de chacune par rapport aux autres. L'aquisition de données en cytométrie permet d'estimer la taille relative de l'évènement détecté, sa complexité interne relative ou granularité et son intensité relative de fluorescence. Les mesures peuvent être réalisées sur des particules d'origines variées comme des cellules, du phytoplancton (Olson *et al*., 1985), des bactéries (Amann *et al.*, 1990), des gamètes (Graham *et al.*, 1990), des virus (Marie *et al.*, 1999).

Un cytomètre en flux est composé de trois systèmes majeurs : la fluidique qui permet d'entraîner l'échantillon cellulaire, l'optique comprenant les sources lumineuses et les tubes photomultiplicateurs et enfin, le système électronique qui permet la conversion de la lumière détectée en données binaires. Dans le cadre de ces travaux de thèse en co-tutelle, les laboratoires d'accueil étaient équipés de deux modèles de cytomètres de la société Becton Dickinson (BD), le FACScalibur™ et le C6 Accuri™. Les expérimentations présentées ont ainsi pu être menées sur l'un ou l'autre de ces modèles selon la disponibilité des appareils. Les différences techniques entre les deux appareils utilisés seront décrites par la suite.

I.1. Rappels historiques

Le 24 août 1934, à Montréal, Andrew Moldavan décrit un premier prototype permettant la numération de cellules passant une à une au travers d'un capillaire *via* un capteur photo électrique monté sur un microscope (Moldavan, 1934).

En 1949, Wallace Coulter dépose un brevet décrivant un « moyen de compter les particules en suspension dans un fluide ». L'appareil se base sur le principe qu'une particule en suspension passant entre deux électrodes entraîne un déplacement de son propre volume d'électrolyte et une modification de la conductance électrique (principe Coulter). Ces changements de conductance sont mesurables sous forme de pulses électriques comptables dont l'amplitude est proportionnelle au volume de la particule.

En 1953, Crosland-Taylor utilise le système de flux laminaire pour le comptage de cellules sanguines. Cette technique consiste à injecter lentement une suspension de particules dans un flux rapide de fluide et permet l'alignement des particules au cœur du flux. Ce principe est actuellement utilisé dans de nombreux modèles de cytomètres.

En 1965, Fulwyler met au point la première méthode permettant le tri de cellules en se basant sur leur taille. Les cellules sont mesurées par principe Coulter puis le fluide est divisé en gouttelettes contenant les cellules. Les gouttelettes sont chargées puis entrent dans un champ électrostatique afin d'être déviées dans des collecteurs.

En 1969, Van Dilla utilise le système de flux laminaire de Crosland-Taylor et utilise une source laser argon-ion pour illuminer des cellules dont l'ADN est marqué par un marquage de Feulgen. La fluorescence émise est détectée par un photomultiplicateur placé à la perpendiculaire du flux, ce qui permet d'observer les différentes phases du cycle cellulaire de cellules d'épithélium ovarien de hamster. De nombreux appareils modernes basent leur architecture sur ce système mais possèdent un plus grand nombre de sources lumineuses et de photomultiplicateurs.

En 1972, Herzenberg développe un outil basé sur les travaux de Van Dilla et Fulwyler permettant d'identifier et trier des cellules selon leur fluorescence (Hulett *et al.*, 1973) et invente le terme FACS pour « Fluorescence Activated Cell Sorter ». Cette machine a été par la suite produite et commercialisée par Becton Dickinson sous le nom de FACS-1.

Les années qui ont suivi ont vu une arrivée sur le marché de nouveaux constructeurs et une évolution des machines par l'ajout de plusieurs lasers et détecteurs permettant l'étude d'un plus grand nombre de paramètres. En 2004, Perfetto et collaborateurs

réalisent l'analyse de 19 paramètres simultanément (17 fluorescents et 2 physiques) à l'aide d'un appareil équipé de quatre lasers et de huit détecteurs.

I.2. Le système de fluidique

Pour pouvoir analyser de façon efficace une grande quantité de cellules en suspension, il est indispensable qu'elles soient séparées afin de passer une à une devant le laser et d'éviter l'apparition de doublets (plusieurs évènements considérés comme un seul). Il est également nécessaire que l'illumination des cellules soit similaire. Cet effet est obtenu suivant le principe de focalisation hydrodynamique. La suspension est injectée dans la chambre d'analyse ou « flow cell » au centre d'un liquide de gaine dont la vitesse, modulable par l'expérimentateur, conditionne celle de l'échantillon tout en empêchant le mélange des fluides. La « flow cell » possède un orifice de sortie plus étroite qui provoque l'accélération du liquide de gaine qui confine un très étroit flux d'échantillon en son centre pour diriger les cellules au travers du faisceau laser. Plus le débit d'injection de l'échantillon sera grand, plus la veine au cœur du liquide de gaine sera large (Figure 2.1).

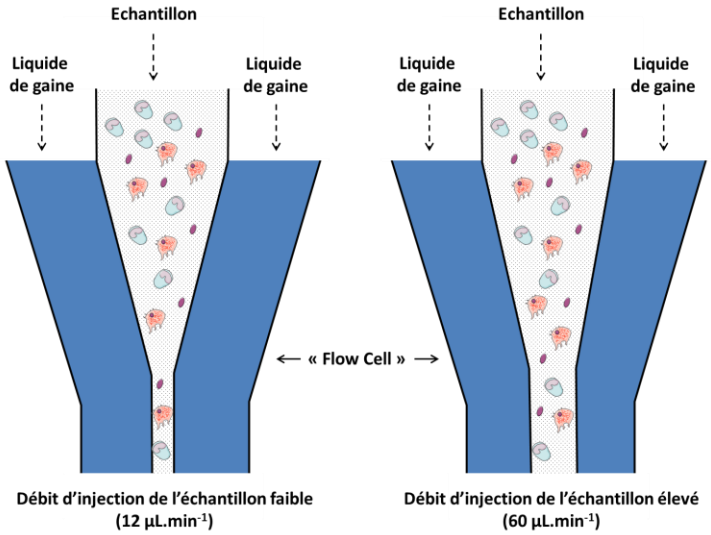


Figure 2. 1 : « Flow cell » où l'échantillon contenant la suspension cellulaire est injecté via le liquide de gaine. La réduction du diamètre en sortie de la « flow cell » entraîne une accélération du liquide de gaine contenant l'échantillon en son centre ce qui permet la séparation des particules. Illustration adaptée d'après Givan, 2004.

Les cytomètres utilisés lors de ces travaux possèdent des systèmes fluidiques différents. Le FACScalibur™ aspire l'échantillon par pression positive. La réserve de liquide de gaine ainsi que l'échantillon sont pressurisés par un compresseur ce qui entraîne un déplacement des fluides au travers des capillaires en direction de la chambre d'analyse (Figure 2.2). Le C6 Accuri est équipé de deux pompes péristaltiques calibrées, l'une entraînant le liquide de gaine dans la « flow cell » et la seconde qui entraîne le liquide de gaine ainsi que l'échantillon de la « flow cell » vers le collecteur de déchets. La différence de pression entre les deux pompes provoque une aspiration de l'échantillon. Ce système permet une mesure précise du volume aspiré et une détermination de valeur de concentrations cellulaires vraies. L'autre différence entre les deux appareils réside dans la possibilité de choisir le débit d'aspiration de l'échantillon de 10 à 100 µL.min^{-1} pour le C6 Accuri™ alors que le FACScalibur™ possède trois vitesses prédéfinies non modifiables (12, 35 et 60 µL.min^{-1}).

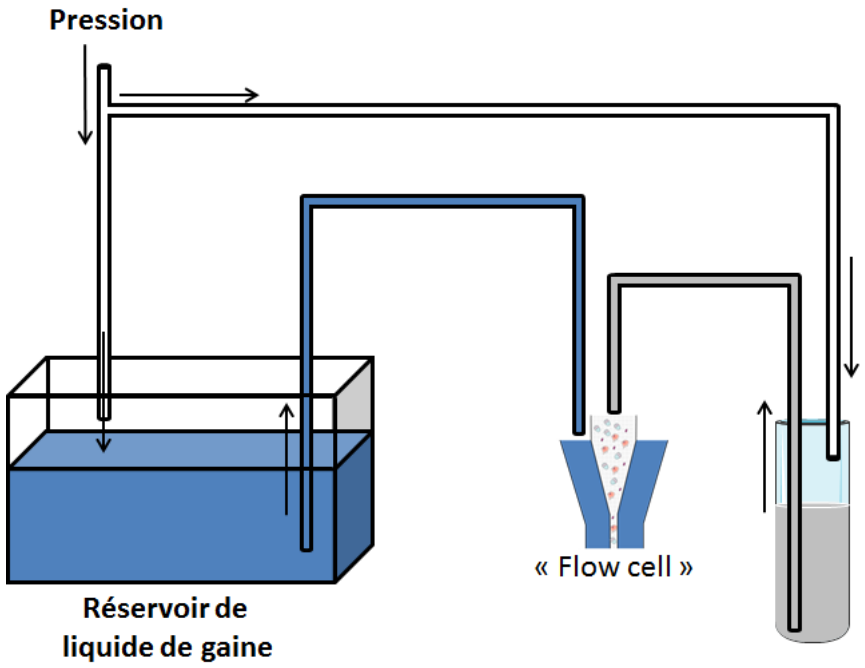


Figure 2. 2 : Représentation schématique d'un système fluidique d'un cytomètre en flux dont les fluides sont entraînés sous pression (cas du FACScalibur™). Illustration adaptée d'après Givan, 2004.

I.3. Le système optique

Dans la plupart des cytomètres en flux, les cellules sont illuminées par un laser qui produit un faisceau monochromatique intense permettant de produire une lumière ou fluorescence diffusée détectable. En général, le laser par défaut des cytomètres produit une longueur d'onde d'excitation de 488 nm compatible avec la fluorescéine. Pour le FACScalibur™ dont nous disposons, la source lumineuse est produite par un unique laser Argon-ion produisant une raie d'excitation à 488 nm alors que le C6 Accuri™ est équipé de deux diodes produisant deux longueurs d'ondes distinctes (488 et 635 nm ou 405 nm selon le modèle).

A la sortie de la « flow cell », les cellules, focalisées au centre du liquide de gaines, passent au travers du faisceau du laser ce qui défini le point d'interrogation. A partir de l'interaction entre la cellule et le laser résultent différents signaux lumineux détectés par des tubes photomultiplicateurs (PMT). La fluorescence, qu'elle soit naturelle (autofluorescence) ou résultante de l'excitation d'un ou plusieurs fluorochromes, est collectée par des photomultiplicateurs. La lumière émise est concentrée par une lentille sur une série de miroirs dichroïques et de filtres optiques qui transmettent ou réfléchissent certaines longueurs d'onde de la lumière et la dirigent vers des photomultiplicateurs spécifiques. La diffusion petit angle (< 90°) ou « forward scatter » (FSC), collectée dans l'axe du faisceau excitateur par une photodiode, permet d'estimer la taille relative de la cellule. L'intensité de lumière détectée par la diffusion grand angle ou « side scatter » (SSC), collectée à un angle supérieur à 90° par rapport à l'axe du laser *via* un photomultiplicateur, permet d'estimer une complexité interne relative de la cellule (granulosité, irrégularités de la surface cellulaire, rapport nucléocytoplasmique…) (Figure 2.3). Ces deux paramètres permettent l'acquisition d'informations sur les caractéristiques physiques de la cellule.

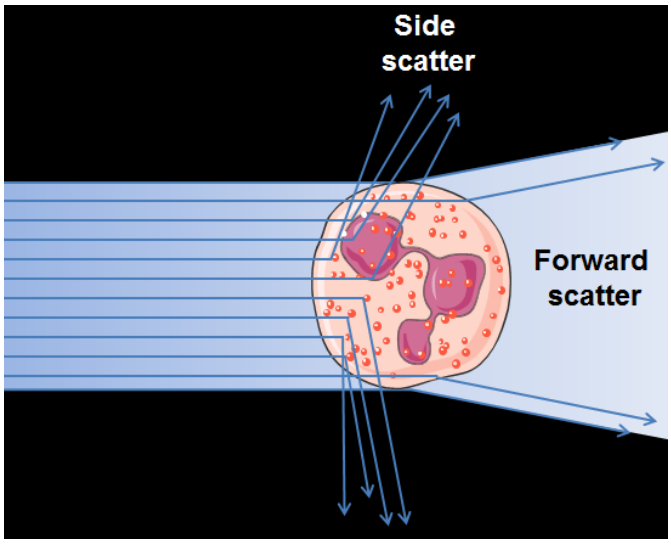


Figure 2. 3 : Principe de diffraction de la lumière émise (autofluorescence) permettant la mesure de la taille et de la complexité cellulaire en cytométrie en flux (illustration adaptée d'après http://regmed.musc.edu/flowcytometry/flowcytometry.html).

Le FACScalibur™ dont nous disposons possède une structure classique et est équipé de quatre PMT dont trois sont attribués à la détection de la fluorescence et un pour détecter la diffraction grand angle (SSC) ainsi qu'une photodiode pour détecter la diffraction petit angle (FSC) (Figure 2.4). Le C6 Accuri™ en plus de posséder un second laser possède un photomultiplicateur supplémentaire (FL-4), ce qui permet un plus grand nombre de possibilités de marquages. Le banc optique de ce système présente une architecture plus simple que l'organisation classique d'un cytomètre car il n'y a aucun miroir dichroïque. Des lentilles dirigent les signaux lumineux qui sont détectés en direct par les PMT placés autour de la « flow cell ». Les filtres optiques sont interchangeables ce qui permet de moduler les longueurs d'ondes récupérées selon le besoin de l'expérience (Figure 2.5).

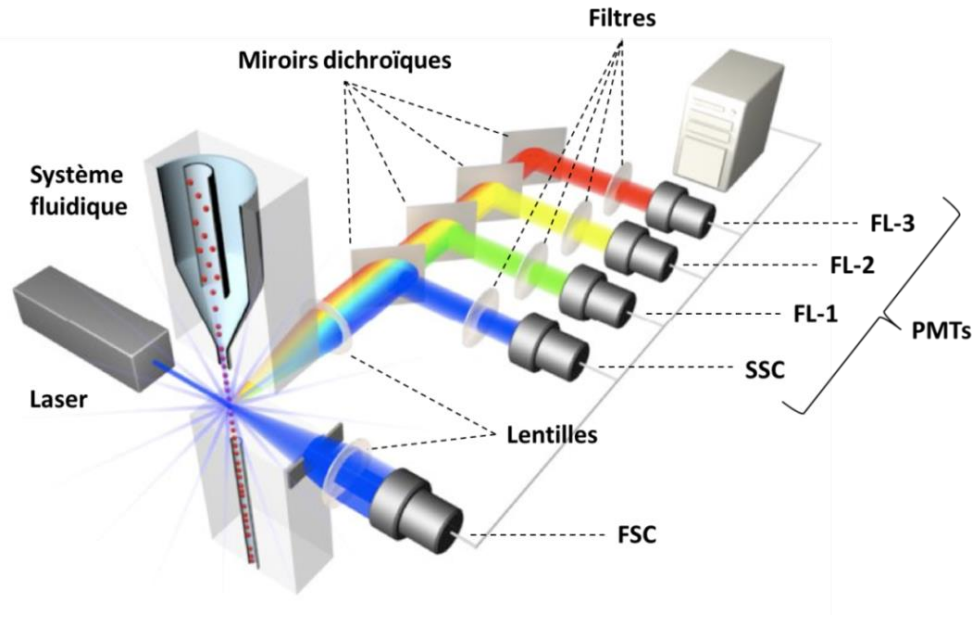


Figure 2. 4 : Bancs optiques des cytomètres Becton Dickinson FACScalibur. L'appareil possède deux photodiodes permettant l'acquisition des données FSC et SSC ainsi que trois PMT relevant chacun les valeurs de fluorescences pour une longueur d'onde spécifique (D'après Rowley 2012).

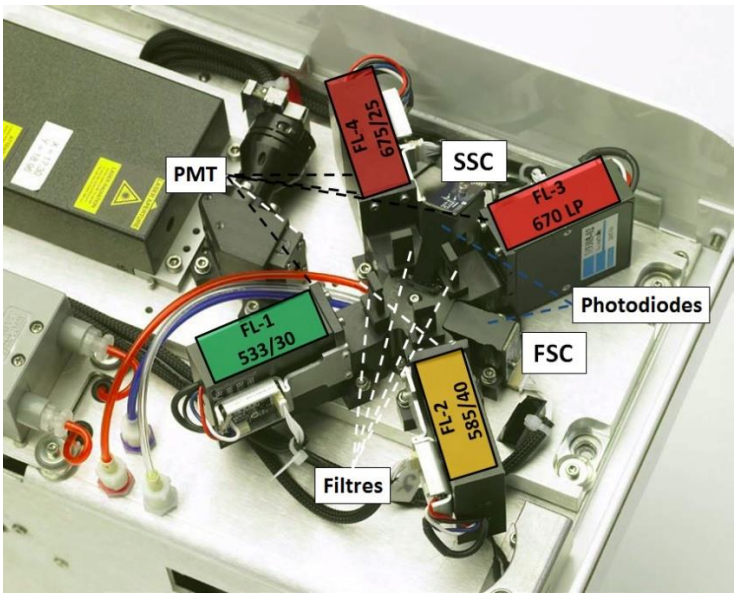


Figure 2. 5 : Banc optique du cytomètre Becton Dickinson C6 Accuri™. L'appareil possède deux photodiodes permettant de l'acquisition de données FSC et SSC ainsi que quatre PMT relevant chacun les valeurs de fluorescences pour une longueur d'onde spécifique.

I.4. Du signal à l'information

Les signaux lumineux (photons) sont collectés et transformés en signaux électriques (impulsions) par les PMTs avant d'être amplifiés et transformés en données numériques par un convertisseur analogique-numérique ou ADC (« Analog to Digital Converter »). Un analyseur multicanaux permet d'associer une amplitude de signal électrique à un numéro de canal (digitalisation). L'empilement successif des données dans les différents canaux permet de constituer un histogramme de la population analysée pour chacun des paramètres mesurés. L'amplification du signal électrique peut être linéaire ou logarithmique. Dans le premier cas, l'intensité du signal est digitalisée sur 1024 canaux (10 bits) et les données sont représentées sur un axe à échelle linéaire qui conserve une proportionnalité des signaux. Si l'amplification est logarithmique, l'amplitude du signal digitalisé sera proportionnelle au logarithme de l'intensité photonique détectée. Les données sont représentées sur un axe logarithmique possédant généralement quatre décades ce qui permet de révéler des différences de fluorescence importantes entre deux évènements.

Le FACScalibur™ possède l'architecture classique décrite précédemment avec un système ADC 10 bits permettant de visualiser les données sur 1024 canaux linéaires ou quatre décades en échelle logarithmique. Il est possible de régler le voltage des PMT afin d'intercaler au mieux le signal sur ces quatre décades. Le C6 Accuri™ possède un système ADC 24 bits lui permettant de digitaliser un signal sur 16 millions de canaux (2^{24}) répartis sur sept décades en amplification logarithmique. Ceci permet la visualisation d'échantillons de taille et fluorescence très variable sans avoir à régler le voltage des PMT.

Les données acquises peuvent être représentées selon différentes modalités. Les histogrammes monoparamétriques qui permettent de représenter la densité d'occurrence d'un paramètre choisi. Cette représentation permet par exemple de visualiser des différences de fluorescence entre des évènements. Les histogrammes biparamétriques ou cytogrammes permettent de visualiser deux paramètres (physiques et/ou fluorescents) simultanément. Ils peuvent être représentés sous forme de nuages

de points. Il est possible d'ajouter une troisième dimension permettant de visualiser la densité ou un paramètre supplémentaire.

I.5. Tri cellulaire

Certains appareils permettent de trier des populations cellulaires hétérogènes à partir de paramètres physiques ou de fluorescence, définis par l'expérimentateur, ce qui permet de récupérer des populations précises. Un des principes de cette technique consiste en l'isolation des cellules après leur passage devant le laser par une onde de vibration qui génère la formation de gouttelettes contenant chacune une cellule. Les gouttes contenant les cellules d'intérêt sont ensuite chargées électriquement avant d'être déviées par un champ électrique pour récupérer les cellules dans des tubes (Givan 2004). Les particules qui n'ont pas été définies comme ayant un intérêt ne sont pas chargées et sont éliminées.

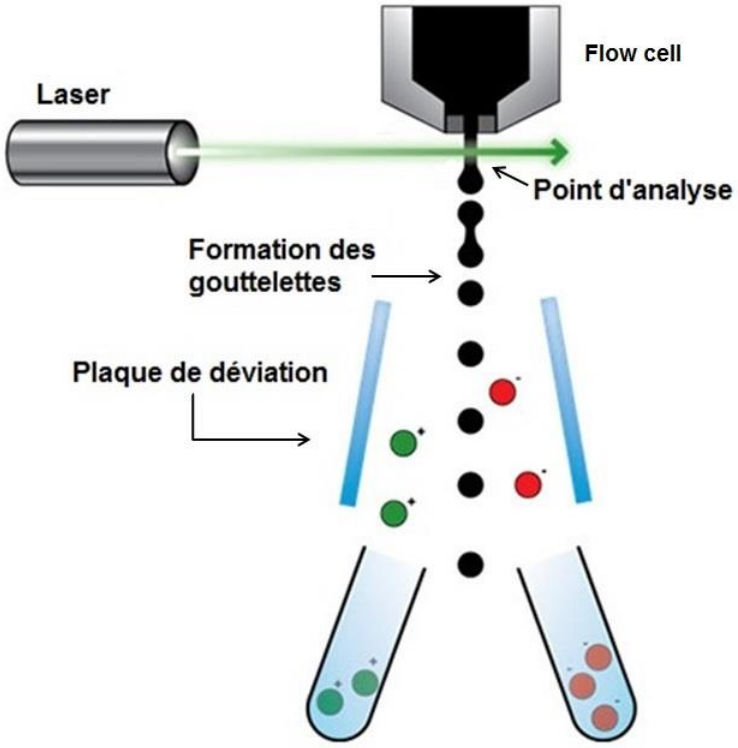


Figure 2. 6 : Principe du tri cellulaire en cytométrie de flux. Modifié à partir de http://www.abcam.com/protocols/fluorescence-activated-cell-sorting-of-live-cells.

I.6. Avantages et limites de la technique de cytométrie en flux

La cytométrie de flux apparait comme étant une technique adaptée à l'étude des activités de populations cellulaires monodispersées, ce qui en fait un appareil de choix pour l'étude de cellules comme les hémocytes. La possibilité de réaliser des analyses multiparamétriques avec une grande vitesse d'acquisition constitue un atout non négligeable. En effet, il est possible d'analyser plusieurs centaines de cellules par seconde ce qui permet de réaliser des mesures sur un plus grand nombre de cellules et d'obtenir une analyse statistique plus fiable. A cette vitesse d'acquisition est associée la capacité d'analyser plusieurs paramètres simultanément et ce, de façon quantitative. L'utilisation de l'amplificateur logarithmique permet de distinguer de faibles différences de fluorescence entre deux évènements et de les quantifier de façon précise.

Malgré les nombreux avantages que possède la cytométrie de flux, elle présente également quelques inconvénients. Le premier est la complexité du traitement des données numériques recueillies. La technique souffre également de l'absence d'image des cellules analysées bien que ce point soit actuellement en cours d'amélioration avec la commercialisation de systèmes couplant l'imagerie à la cytométrie. L'autre limite concerne la réalisation de cinétique à l'échelle d'une cellule. L'analyse étant réalisée à un temps donné, il n'est pas possible de suivre l'évolution d'un paramètre mesuré sur une même cellule. Un grand nombre de sondes fluorescentes permettant l'étude de différents compartiments ou activités cellulaires ont été développées pour une utilisation en cytométrie de flux. Cependant, ces réactifs sont mis au point sur des modèles cellulaires vertébrés et leur utilisation sur des modèles hémocytaires n'est pas toujours possible. Enfin, l'acquisition d'un tel matériel est coûteuse et nécessite un investissement financier initial conséquent.

II. Développement méthodologique

Cette partie du manuscrit est consacrée au développement des méthodes permettant d'étudier les fonctionnalités hémocytaires chez la dreissène. Ces expérimentations ont été menées en France et au Québec sur des animaux prélevés respectivement au Lac du Der (48°60'12,294''N, 4°44'32.535''E) ou à Pointe-des-Cascades (45°19'49.9"N, -

73°58'11.8"W). Les animaux ont été maintenus au laboratoire dans des aquariums contenant de l'eau minérale, aérée par un bullage et à la température du milieu au moment du prélèvement. Les moules ont été alimentées trois fois par semaine avec une solution algale commerciale.

II.1. Prélèvements d'hémolymphe

L'hémolymphe a été prélevée au niveau du muscle adducteur postérieur et du muscle rétracteur postérieur du byssus (Figure 2.7). Une légère incision est réalisée au niveau du ligament de l'animal et le prélèvement est réalisé à l'aide d'une seringue stérile de 0,5 mL et d'une aiguille de gauge 29. Les prélèvements sont réalisés sans retrait de liquide intervalvaire ce qui permet de récupérer une plus grande quantité d'hémolymphe (250 µL en moyenne) et d'hémocytes, notamment les cellules présentes au niveau du fluide extra-palléale (Allam & Paillard 1998). Chaque prélèvement est conservé de façon individuelle dans un tube de 1,5 mL avant utilisation. La mesure d'osmolarité des fluides prélevés indique une valeur moyenne de 50,3 ± 7,7 $mOsm.kg^{-1}$ contre une valeur de 9,6 ± 2,6 $mOsm.kg^{-1}$ pour l'eau utilisée pour la stabulation des animaux ce qui indique bien la présence d'hémolymphe dans l'échantillon prélevé.

Figure 2. 7 : Prélèvement d'hémolymphe réalisé chez la dreissène. A : localisation des muscles où sont réalisés les prélèvements. B : Incision du ligament. C : Ponction de l'hémolymphe.

II.2. Choix du milieu de maintien des hémocytes

Les manipulations d'hémocytes *ex vivo* nécessitent de pouvoir maintenir les cellules sans altération de leur physiologie. Ceci implique de pouvoir les placer dans un milieu permettant le maintien de leurs fonctions dans des conditions ioniques compatibles avec celles de leur hémolymphe. Des travaux ont été menés dans cette optique par Quinn et collaborateurs en 2009 qui ont défini un milieu de maintien pour cellules branchiales et hémocytaires chez *Dreissena polymorpha*. Le système circulatoire étant semi-ouvert chez les mollusques, l'hémolymphe n'est pas un tissu dénué de contaminations biologiques et rend nécessaire l'utilisation d'antibiotiques afin de limiter le développement bactérien.

Les travaux de Quinn *et al.*, 2009 présentent la mise au point d'un milieu de culture permettant le maintien des cellules hémocytaires sur une durée de 14 jours dans un milieu Leibovitz's L-15 à 15% (L15-15%). Ces conditions de maintien ont été utilisées par la suite lors d'une étude visant à tester la cytotoxicité de molécules pharmaceutiques sur plusieurs tissus de dreissène dont les hémocytes (Parolini *et al.*, 2011b). Cette dernière étude présente une exposition des hémocytes à des contaminants pendant 96 heures. En vue de notre nécessité de maintenir les hémocytes sur une période de 24 heures, nous avons pris la liberté de ne pas réaliser de prétraitements aux antibiotiques après le prélèvement des hémocytes qui nécessite des étapes de centrifugations des cellules. L'utilisation d'antibiotiques dans le milieu a été ajustée d'après Latire *et al.*, 2012 et Rioult *et al.*, 2013. Nous avons également fait le choix de ne pas ajouter de sérum de veau fœtal au milieu de maintien pour limiter les variabilités entre les lots de sérum mais aussi pour éviter les modulations d'activités biologiques liées à la présence de molécules ou facteurs dans le sérum. La mesure d'osmolarité du milieu indique une valeur moyenne de 70,75 ± 1,7 $mOsm.kg^{-1}$ et sa composition est détaillée dans le tableau 2.1.

Tableau 2. 1 : Composition du milieu de maintien hémocytaire L15-15% utilisé chez la dreissène. Comparaison entre la formulation de Quinn *et al.*, 2009 et celle utilisée dans nos études.

Quinn *et al.*, 2009		Milieu utilisé	
Prétraitement		**Prétraitement**	
Décontamination échantillon (30 minutes)			
Pénicilline	100000 UI.L^{-1}		
Streptomycine	100 mg.L^{-1}		
Gentamicine	80 mg.L^{-1}		
Kanamycine	40 mg.L^{-1}		
Milieu de maintien (pour 1L)		**Milieu de maintien (pour 1L)**	
Eau distillée	850 mL	Eau distillée	850 mL
Leibovitz L-15 media	150 mL	Leibovitz L-15 media	150 mL
HEPES	2,38 g	HEPES	2,38 g
Rouge phénol	10 mg	Rouge phénol	10 mg
Pénicilline	25 000 UI	Pénicilline	100 000 UI
Streptomycine	25 mg	Streptomycine	100 mg
Gentamicine	100 mg		
Kanamycine	10 mg		
L-Glutamine	2 mM	L-Glutamine	2 mM
Sérum veau fœtal	10% v/v		
pH : 7.5		**pH : 7.5**	

II.3. Limiter l'agrégation cellulaire

Les cellules hémocytaires possèdent une capacité d'agrégation (Figure 2.8) qui peut être contraignante lors des expérimentations et empêcher une analyse convenable en cytométrie de flux. On retrouve généralement deux méthodologies permettant d'éviter ce phénomène. La première consiste en l'utilisation de solution anti-agrégante contenant de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), un chélateur d'ions divalents et

notamment du calcium impliqué dans les mouvements du cytosquelette (Bennett & Weeds 1986). Il a également été démontré par Torreilles et collaborateurs (1999) un effet de ces solutions sur l'activité oxydative des hémocytes de *Mytilus galloprovincialis*. Nos travaux reposant en partie sur la mesure des activités phagocytaire et oxydative des hémocytes, l'utilisation de ces solutions n'a pas été retenue afin de limiter les biais de mesure de ces paramètres. La seconde méthode pour limiter l'agrégation consiste en l'utilisation de glace qui permet d'inhiber les activités cellulaires et limiter ainsi l'agrégation (Auffret & Oubella 1997).

Afin de tester les effets de la glace sur les cellules hémocytaires, des prélèvements d'hémolymphe ont été réalisés et analysés directement après prélèvement ainsi qu'après 10 minutes d'incubation sur glace et à température ambiante.

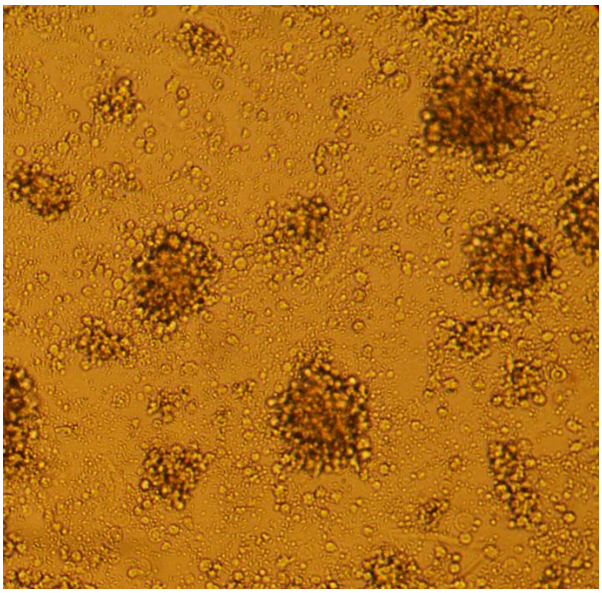


Figure 2. 8 : Agrégation hémocytaire spontanée observée chez la dreissène.

II.3.1. Résultats et choix protocolaire

Les cytogrammes obtenus après incubation sur glace révèlent un déplacement des populations hémocytaires résultant en une diminution de taille (FSC-H) et une augmentation de complexité (SSC-H) qui ne permet pas d'identifier différentes sous-populations (Figure 2.9). Suite à ces observations, il a été choisi de ne pas utiliser la

glace pour empêcher l'agrégation et de limiter au maximum les manipulations cellulaires après leur prélèvement (pas de centrifugation) afin d'éviter une stimulation des cellules pouvant entraîner leur agrégation.

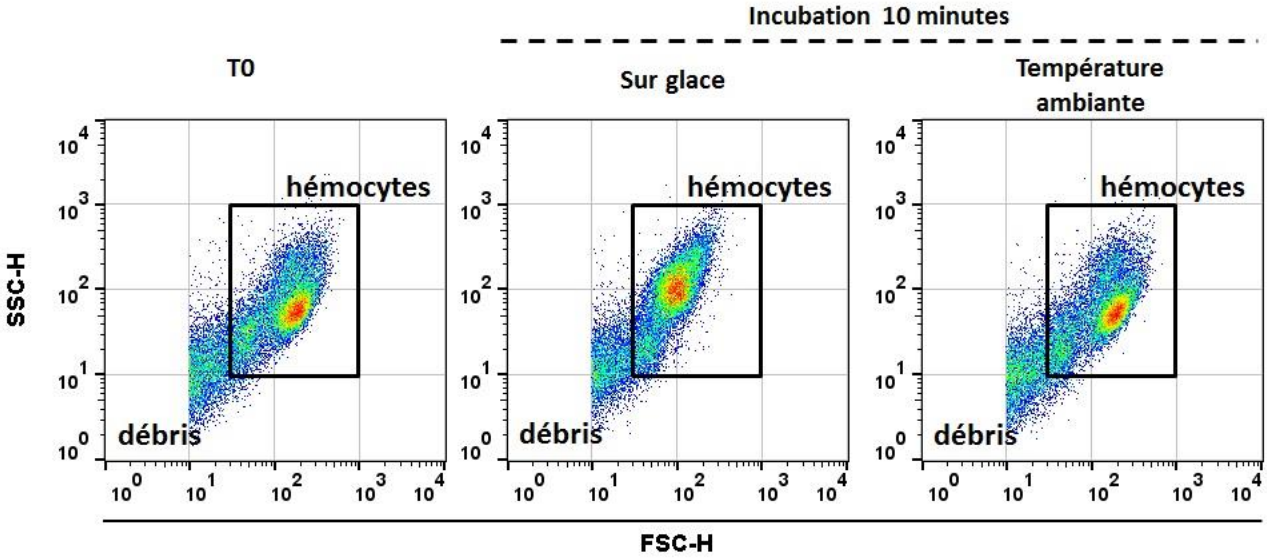


Figure 2. 9 : Evolution des nuages de points représentant les populations hémocytaires chez la dreissène après 10 minutes d'incubation sur glace ou à température ambiante (N=6).

II.4. Mesure de mortalité cellulaire

Pour évaluer la mortalité cellulaire, nous utilisons l'iodure de propidium (IP), une sonde fluorescente qui pénètre les cellules dont la membrane est altérée (cellules mortes). En tant qu'agent intercalant fluorescent, il se fixe sur les acides nucléiques (ADN, ARN). Après excitation par un laser à 488 nm, les cellules mortes émettent une fluorescence mesurable dans le rouge (FL3 : 670 Longpass) ou l'orange (FL2 : 585/42) (Figure 2.10 A). D'après la littérature, ce test est largement utilisé en cytométrie de flux pour l'évaluation de la mortalité hémocytaire mais des divergences sont notables entre les protocoles utilisés. On retrouve des concentrations en IP comprises entre 10 et 50 $\mu g.mL^{-1}$ et des temps d'incubation variant de 10 à 60 minutes (Tableau 2.2).

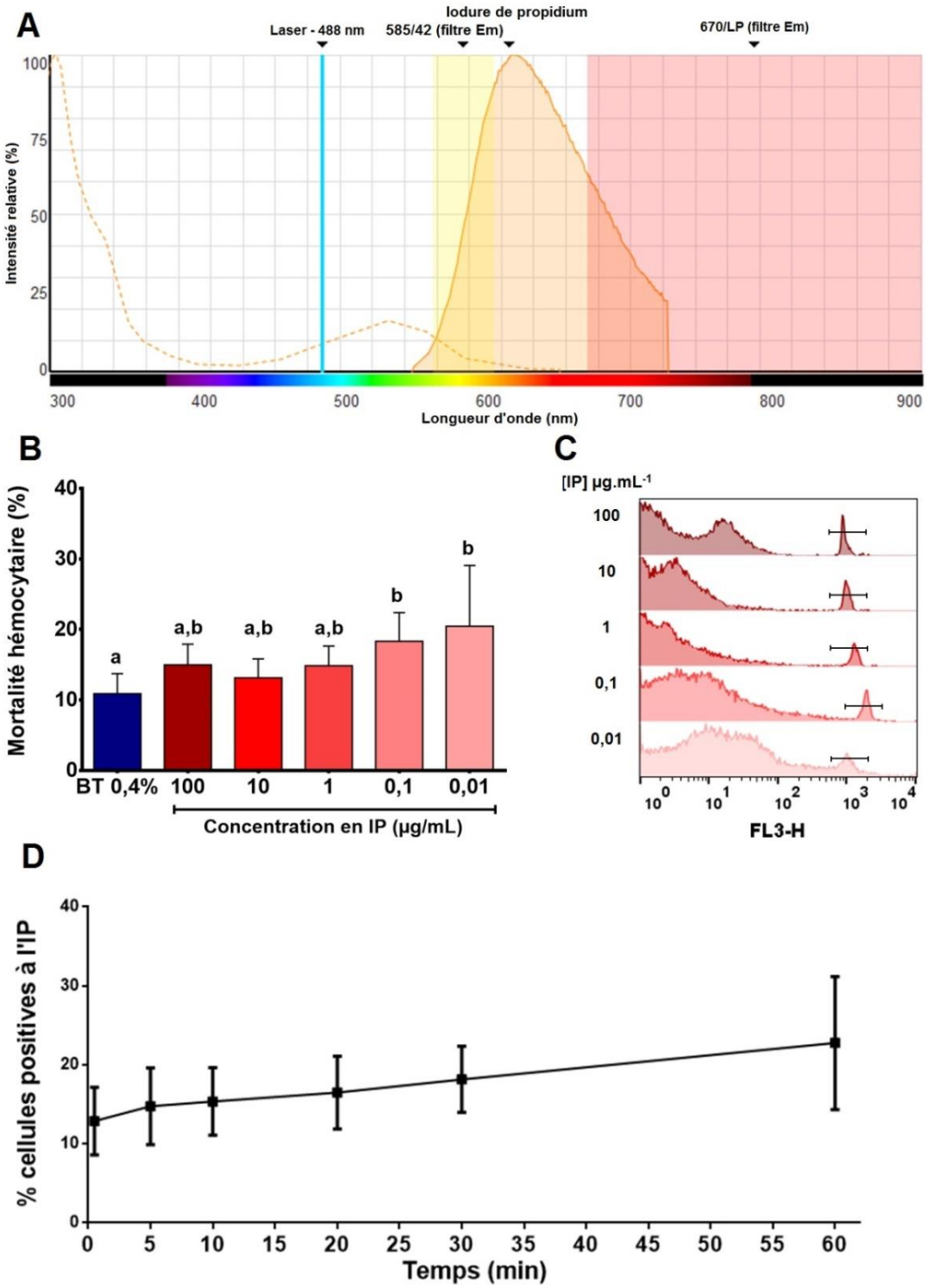


Figure 2. 10 : Optimisation du protocole de marquage à l'iodure de propidium des cellules hémocytaires mortes chez la moule zébrée. A : Spectre d'excitation (trait pointillé) et d'émission (trait plein) de fluorescence de l'iodure de propidium après

excitation par un laser de longueur d'onde 488 nm ; B : Effet de la concentration en IP sur la mesure de mortalité cellulaire (moyenne ± écart type ; N=6). Les lettres indiquent les groupes homogènes pour chaque concentration et sont déterminés par le test de Tukey suite à une différence significative détectée par l'ANOVA ($p < 0,05$) ; C : Histogrammes de fluorescence obtenus en fonction de la concentration en IP ; D : Evolution sur 60 minutes du marquage d'hémocytes à l'iodure de propidium (moyenne ± écart type ; N=6).

Tableau 2. 2 : Différentes conditions d'utilisation de l'iodure de propidium observées dans la littérature pour évaluer la mortalité hémocytaire.

Référence	Concentration	Temps d'incubation
Gagnaire *et al.*, 2004 b	50 µg.mL^{-1}	30 min
Soudant *et al.*, 2004	10 µg.mL^{-1}	10 min
Delaporte *et al.*, 2007	10 µg.mL^{-1}	60 min
Canesi *et al.*, 2008	20 µg.mL^{-1}	10 min
Prado-Alvarez *et al.*, 2012	25 µg.mL^{-1}	10 min
Wang *et al.*, 2012	25 µg.mL^{-1}	30 min

II.4.1. Concentration optimale

Afin de déterminer la concentration optimale d'utilisation du réactif chez la dreissène, nous avons testé plusieurs concentrations en IP et comparé les résultats avec ceux des mesures réalisées en utilisant le bleu Trypan 0,4% sur les mêmes échantillons. Les hémocytes ont été incubés pendant 10 minutes à température ambiante avec des concentrations en IP comprises entre 0,1 et 100 µg.mL^{-1}. L'iodure de propidium utilisé est une solution commerciale concentrée à 1 mg.mL^{-1}.

II.4.1.a Résultats et choix protocolaire

Les résultats indiquent que les données de mortalité hémocytaire acquises avec les concentrations les plus faibles en IP sont statistiquement différentes des résultats obtenus *via* l'analyse au bleu Trypan (Figure 2.10 B). Ceci n'est cependant pas lié à un problème de toxicité à faible concentration mais une contrainte analytique. L'utilisation d'une concentration trop faible en IP ne permet pas une bonne distinction entre l'autofluorescence des cellules et la fluorescence des cellules positives à la sonde (Figure 2.10 C). La concentration retenue est 10 µg.mL^{-1} car elle ne présente pas de différence significative avec la mesure au bleu Trypan et d'un point de vue pratique, il est possible d'utiliser la solution commerciale sans dilution.

II.4.2. Cinétique de marquage

Le second point consiste en la détermination du temps d'incubation optimale avec la sonde. Pour ce faire, des échantillons ont été marqués à l'IP (10 µg.mL^{-1}) et placés à incuber à 16°C à l'obscurité avant d'être analysés dans le temps sur 60 minutes.

II.4.2.a Résultats et choix protocolaire

Le suivi de l'évolution du marquage à l'IP démontre qu'à la concentration de 10 µg.mL^{-1}, le marquage des cellules est instantané et stable sur une période de 60 minutes (Figure 2.9 D) (ANOVA p = 0.052). On observe cependant une tendance à l'augmentation du taux de cellules marquées. Une lecture directement après ajout d'IP à une concentration finale de **10 µg.mL^{-1}** a été retenue comme protocole afin de déterminer le taux de cellules mortes.

II.5. Mesure de l'activité de phagocytose hémocytaire

Pour déterminer l'activité de phagocytose des cellules hémocytaires, nous avons choisi d'utiliser des billes de latex fluorescentes en nous basant sur le protocole de Brousseau *et al.*, 1998. Cette méthodologie a été fréquemment utilisée pour étudier l'immunocompétence de mollusques et certains points de méthodologie peuvent varier entre les auteurs (Tableau 2.3). Plusieurs études spécifient le volume d'hémolymphe utilisé pour la mesure de phagocytose sans préciser de concentration hémocytaire utilisée. On supposera que la concentration cellulaire n'est pas déterminée, ce qui ne permet pas d'ajuster le volume de billes ajoutées afin d'avoir un ratio billes : cellules constant.

Nous avons cherché à déterminer les paramètres optimaux pour réaliser la mesure en testant l'effet de plusieurs variables, notamment le temps d'incubation, la concentration cellulaire, le ratio billes/hémocyte ainsi que la taille des billes.

Tableau 2. 3 : Paramètres utilisés d'après la littérature pour mesurer l'activité de phagocytose chez les mollusques à l'aide de billes fluorescentes. ND = non déterminé ; NS = Non spécifié.

Référence	Temps d'incubation (H)	[Cellulaire] cellules mL^{-1}	Taille de bille (µm)	Ratio billes / hémocyte
Xue *et al.*, 2001	18	ND	1,7	ND
Sauvé *et al.*, 2002	18	$1x10^6$	1,716	100:1
Gagnaire *et al.*, 2006 a	1	$1x10^6$	1	~220:1
Duchemin *et al.*, 2007	4	ND	2	30:1
García-García *et al.*, 2008	2	NS	1	10:1
Malagoli *et al.*, 2008	0,5	$1x10^5$	1	~450:1
Donaghy *et al.*, 2009a	2	ND	2	ND
Le Foll *et al.*, 2010	2	ND	2	>50:1
Latire *et al.*, 2012	1	ND	1	630:1
Caza *et al.*, 2015	18	$5x10^5$	1,2	100:1

II.5.1. Cinétique d'incubation

Deux cinétiques d'incubation ont été suivies au cours de l'expérimentation. Pour chaque cinétique, 4 tubes contenants 50 000 cellules dans 250 µL de milieu à un ratio de 100 billes par hémocyte sont placés à 16°C et analysés après 1, 4, 6 et 18 heures d'incubation. Pour l'une des deux cinétiques un gradient de BSA (3%) est réalisé à chaque temps d'analyse afin d'éliminer une partie des billes surnuméraires. D'un point de vue analytique, un hémocyte est considéré comme phagocytaire lorsqu'il a phagocyté au minimum trois billes (Figure 2.11).

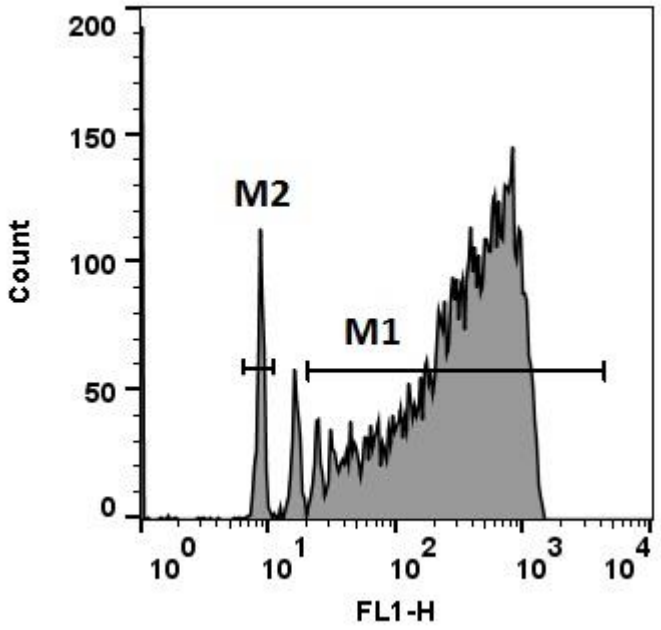


Figure 2. 11 : Histogramme de fluorescence pour la mesure du taux de cellules phagocytaires. La fluorescence est émise par les billes de latex phagocytées après excitation par un laser à 488 nm. Elle est mesurée en cytométrie de flux après 18 heures d'incubation. Le marqueur M1 est positionné sur les hémocytes ayant phagocyté au moins trois billes et permet de déterminer le taux de phagocytose. Le nombre moyen de billes phagocytées est déterminé en divisant la moyenne de fluorescence de M1 par la moyenne de fluorescence de M2 (hémocytes ayant phagocyté une bille).

Résultats et choix protocolaire

A partir des données obtenues, on observe que l'utilisation du gradient de BSA lors des 4 premières heures d'incubation entraîne une différence importante du taux de phagocytose, ce qui suggère qu'une partie des billes n'est pas internalisée sur cette période (Figure 2.12 A). Après 18 heures d'incubation, cette différence n'est plus présente et le plus fort taux de phagocytose mesuré est atteint. Un temps d'**incubation de 18 heures** a été retenu pour la mesure de phagocytose chez la dreissène. L'observation en microscopie confocale de cellules après 18 heures d'incubation a permis de s'assurer de l'internalisation des billes (Figure 2.13).

II.5.2. Effet du ratio de billes par hémocyte

Afin de déterminer l'influence du ratio de billes par hémocyte sur l'activité de phagocytose, 50 000 hémocytes dans 250 µL de milieu ont été placés en incubation avec des ratios de 100 : 1, 75 :1, 50 :1 et 25 :1 pendant 18 heures à 16°C avant analyse en cytométrie de flux.

Résultats et choix protocolaire

D'après l'analyse des résultats, aucun des ratios testés n'entraîne de différence sur le taux de phagocytose des hémocytes (ANOVA p= 0,067 ; Figure 2.12 B). Cependant, si le nombre moyen de billes phagocytées est considéré, des différences significatives apparaissent pour le plus faible ratio (ANOVA p= 0,032 ; Figure 2.12 B). Pour un ratio compris entre 100 et 50 :1, les billes sont en excès par rapport aux capacités de phagocytose des hémocytes et ne constituent pas un facteur limitant l'activité. Le **ratio de 100 :1** a été conservé pour les analyses de phagocytose en cytométrie chez la dreissène.

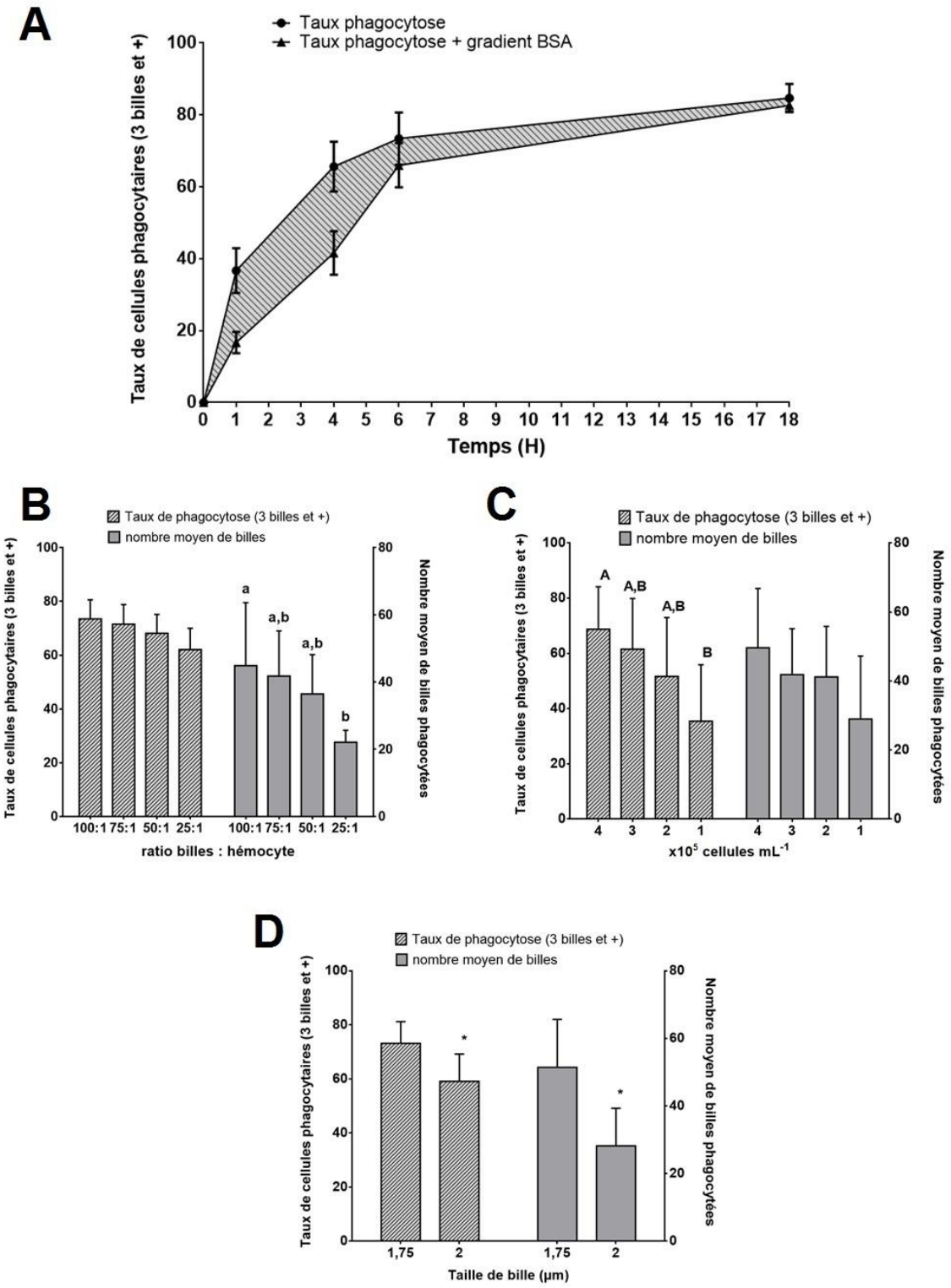


Figure 2. 12 : Optimisation du protocole de mesure de l'activité de phagocytose des hémocytes chez la moule zébrée. A : Evolution dans le temps du taux de phagocytose : les cellules sont analysées après 1, 4, 6 et 18 heures d'incubation

avec les billes. Pour chaque temps, l'analyse est réalisée avec et sans l'utilisation de gradient de BSA. B : Effet du ratio bille : hémocyte sur le taux de phagocytose et le nombre moyen de billes phagocytées après 18 heures d'incubation. Les cellules ont été placées en incubation avec différents ratio de billes par hémocyte. C : Effet de la concentration cellulaire sur le taux de phagocytose et le nombre moyen de billes phagocytées après 18 heures d'incubation. Différentes concentrations cellulaires ont été placées en incubation avec ratio de billes par hémocyte fixe de 100 :1. D : Effet de la taille des billes de latex sur le taux de phagocytose et le nombre moyen de billes phagocytées après 18 heures d'incubation. Les cellules ont été placées en incubation avec des billes de 1,75 ou 2 µm. Les lettres et les astérisques indiquent les groupes homogènes et les différences significatives entre les conditions testées (ANOVA et Student t-test respectivement). N=6 pour chaque expérimentation et les données sont exprimées en moyenne ± ET.

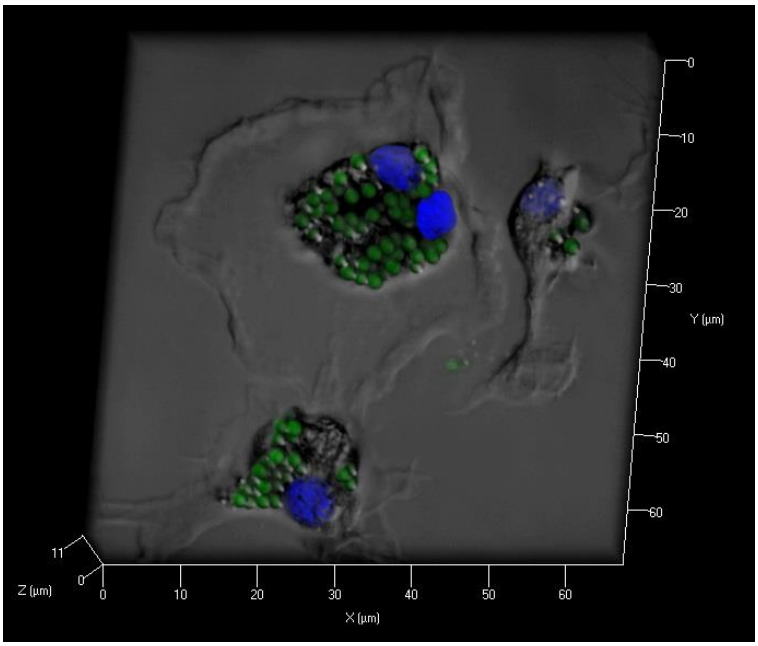


Figure 2. 13 : Observation en microscopie confocale d'hémocytes après 18 heures d'incubation avec des billes fluorescentes. Le marquage des noyaux a été réalisé au Hoechst 3342 (10 µM).

II.5.3. Effet de la concentration cellulaire

Afin de déterminer l'influence de la concentration cellulaire sur l'activité de phagocytose, des hémocytes à la concentration entre 400 000 et 100 000 cellules.mL^{-1} ont été mis en contact avec des billes fluorescentes à un ratio 100 :1 pendant 18 heures avant analyse.

Résultats et choix protocolaire

A partir des données obtenues, les résultats indiquent que la concentration cellulaire testée la plus faible (100 000 cellules.mL^{-1}) présente un taux de phagocytose significativement inférieur à la plus forte concentration cellulaire testée (ANOVA p = 0,036 ; Figure 2.12 C). Aucune différence n'a été observée pour le nombre moyen de billes phagocytées (ANOVA p = 0,195 ; Figure 2.12 C). Ce phénomène pourrait s'expliquer par une plus faible sécrétion de facteurs opsoniques par les hémocytes, qui aurait pour conséquence une réduction du taux de phagocytose. L'étude de l'opsonisation des particules phagocytaires ne sera pas développée dans ces travaux mais constituent un sujet intéressant dans la compréhension des mécanismes associés à la phagocytose.

Selon les besoins en quantité de cellules pour les expérimentations, la **concentration de 400 000 ou 200 000 cellules.mL^{-1}** seront utilisées dans les travaux présentés.

II.5.4. Effet de la taille des billes sur l'activité de phagocytose

Nous avons déterminé l'influence du diamètre des billes fluorescentes utilisées sur l'activité de phagocytose. Pour ce faire, des hémocytes ont été exposés selon les conditions déterminées précédemment à des billes fluorescentes de 1,75 ou 2 µm.

Résultats et choix protocolaire

D'après les résultats obtenus, la taille des billes utilisées pour les expérimentations influence le taux d'hémocytes phagocytaires mesuré ainsi que le nombre moyen de billes phagocytées (Student t-test p = 0.025 ; p = 0.012 respectivement) (Figure 2.12 D).

D'après notre expérience, une augmentation de la taille des billes de 0,25 µm entraîne une réduction du taux de cellules phagocytaire de l'ordre de 10% et une réduction du nombre de billes phagocytées d'environ 40%. Il serait intéressant de pouvoir tester une gamme très large de billes de phagocytose pour déterminer les tailles seuils de billes que les cellules ne pourront pas phagocyter.

Lors de l'achat de ce réactif, les fournisseurs vendent des billes fluorescentes pour une taille nominale donnée mais la taille effective peut être différente selon les lots. En effet, certains fabricants indiquent une variation entre 1 et 5% de la taille effective comparé aux valeurs nominales de taille de billes. Il faut veiller à ne pas changer de lot de billes entre les expérimentations pour limiter au maximum les variations de tailles afin de pouvoir plus facilement comparer les résultats.

II.5.5. Utilisation d'un fixateur de cellule pour analyse ultérieure

D'un point de vue expérimental, il n'est pas toujours possible de réaliser les analyses en cytométrie de flux dès la fin du temps d'incubation. Nous avons déterminé s'il était possible d'utiliser un fixateur de cellules pour réaliser l'analyse ultérieurement. La solution testée est composée de milieu de maintien des cellules avec 0,5% v/v formaldéhyde 37% et 2 $g.L^{-1}$ de sodium azide. Des échantillons de phagocytose ont été subdivisés en deux lots (N=6). Le premier a été analysé directement après 18 heures d'incubation et l'autre a été fixé, conservé à 4°C et analysé 48 heures après fixation.

Résultats et choix protocolaire

Les résultats indiquent que les analyses réalisées 48 heures après fixation conduisent à des résultats identiques à ceux acquis sur échantillons frais (Student t-test p = 0,320). L'**utilisation de cette solution de fixation** permet d'échelonner les analyses d'échantillons de phagocytose sur au moins 48 heures.

II.5.6. Utilisation de témoins positifs

Nous avons testé trois conditions pour inhiber le processus de phagocytose. Pour ce faire, 50 000 hémocytes dans 250 µL de milieu L15-15% ont été placés en incubation à 16°C pendant 18 heures pour constituer un témoin. En parallèle, un tube a été incubé à 4°C pour une inhibition par des températures basses. Un troisième échantillon est réalisé en incubant les hémocytes en présence de cytochalasine B, un inhibiteur de polymérisation des filaments d'actine, à la concentration de 10 µg.mL^{-1} à 16°C. La dernière condition consiste en une incubation des hémocytes avec la cytochalasine B à 4°C.

Les résultats obtenus indiquent que l'utilisation de basses températures (4°C) seul ne constitue pas un inhibiteur efficace de la phagocytose pour les hémocytes de dreissène. L'analyse statistique révèle que cette condition n'est pas significativement différente du témoin bien qu'une forte variabilité soit apparente. La plus forte inhibition est observée pour l'incubation des hémocytes en présence de cytochalasine b à 4°C (Figure 2.14)

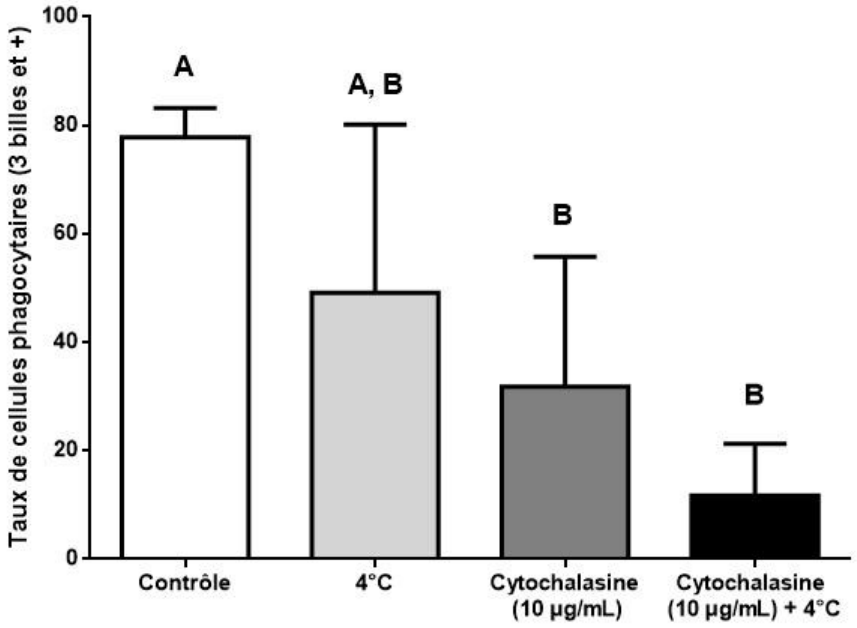


Figure 2. 14 : Mesure de l'inhibition de la phagocytose après 18 heures d'incubation des hémocytes à 4°C, en présence de cytochalasine b à 16°C ou 4°C.

II.6. Mesure de l'activité oxydative hémocytaire

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les hémocytes est liée à l'activité de dégradation des particules phagocytées. Le protocole permettant de mesurer l'activité oxydative hémocytaire a été mis au point chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* et publié par Lambert et collaborateurs en 2003. Cet article fait référence et le protocole mis au point dans ces travaux a été utilisé chez de nombreuses espèces de mollusques. La mesure repose sur l'utilisation du réactif 2,7'-Dichlorofluoresceine diacétate (DCFH-DA) afin de mesurer l'activité oxydative basale des hémocytes. Le DCFH-DA est une molécule apolaire et non fluorescente qui diffuse librement au travers des membranes cellulaires. La sonde est dé-esterifiée en dichlorofluorescéine (DCFH) par les estérases intracellulaires ce qui la polarise et permet son maintien au sein de la cellule. Le DCFH est rapidement oxydé en DCF fluorescent par les espèces réactives de l'oxygène produites au niveau intra-cellulaire (Figure 2.15 A et B). Il a été déterminé que le DCFH était oxydé par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux hydroxyles (HO°) et peroxyles (ROO°) mais aussi l'oxyde nitrique (°NO) et l'anion peroxynitrique ($ONOO^-$) (Gomes *et al.*, 2005). Les travaux de Lambert *et al.*, 2003 concluent que parmi les concentrations en DCFH-DA testées, la concentration optimale est 10µM. Cependant, si dans la littérature, cette concentration est très largement utilisée pour les mesures d'activité oxydative chez les mollusques, il existe des divergences quant au temps d'incubation utilisé (Tableau 2.4).

Tableau 2. 4 : Différents temps d'incubation observés dans la littérature utilisant le DCFH-DA à la concentration de 10 µM pour mesurer l'activité oxydative des hémocytes de mollusques.

Référence	Incubation (min)	Référence	Incubation (min)
Hégaret *et al.*, 2003	30 - 120	Donaghy *et al.*, 2012b	30
Labreuche *et al.*, 2006	60	Di *et al.*, 2013	30 -150
Delaporte *et al.*, 2007	120	Hong *et al.*, 2014	90
Araya *et al.*, 2009	120	Astuya *et al.*, 2015	90
Donaghy *et al.*, 2010	10 - 180	Koutsogiannaki *et al.*, 2015	20

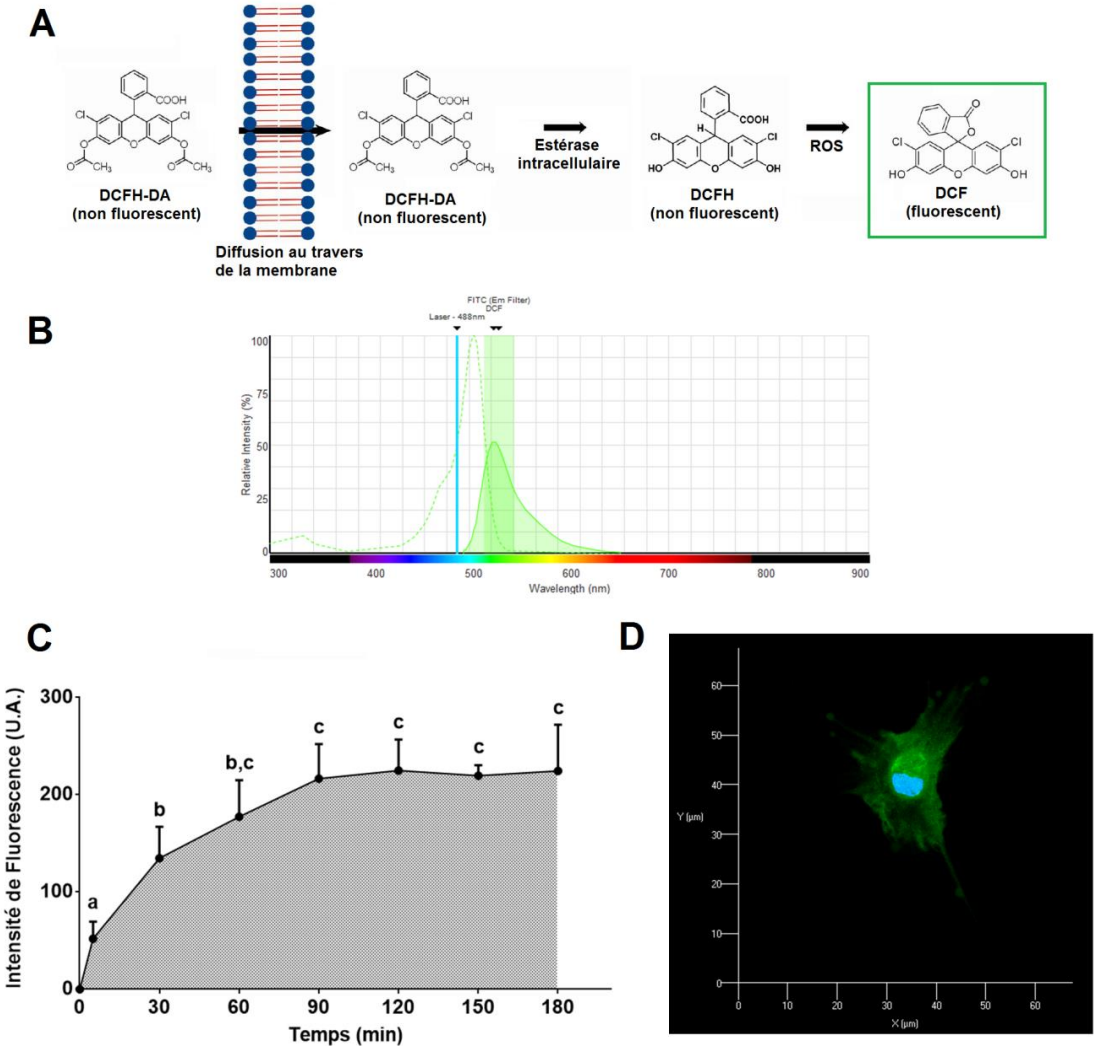


Figure 2. 15 : Optimisation du protocole de mesure de l'activité oxydative dans les hémocytes de dreissène. A : Mécanisme du test. Après diffusion au travers de la membrane cellulaire, le DCFH-DA est dé-esterifiée par les estérases intracellulaires avant d'être oxydé en DCF fluorescent. B : Spectre d'excitation (trait pointillé) et d'émission (trait plein) de fluorescence du DCF après excitation par un laser de longueur d'onde 488 nm. C : Cinétique de marquage des hémocytes avec du DCFH-DA à 10 µM (N=6, moyenne ± ET), l'intensité de fluorescence (Unité Arbitraire) émise par la sonde est mesurée par cytométrie de flux (BD FACScalibur). Les lettres indiquent les groupes homogènes pour chaque concentration et sont déterminés par le test de Tukey quand l'ANOVA indique des différences significatives ($p < 0,05$). D : Observation en microscopie confocale de la fluorescence émise après 120 minutes d'incubation des hémocytes avec du DCFH-DA (+ Hoechst 33342 10 µM).

II.6.1. Cinétique de marquage

En se basant sur les travaux de Lambert *et al.*, 2003, un suivi de l'évolution de la fluorescence des cellules a été réalisé pendant 180 minutes avec un pas de 30 minutes. Les cellules à la concentration de 200 000 cellules.mL^{-1} ont été placées en incubation à 16°C et à l'obscurité avec une concentration finale en DCFH-DA de **10 µM**.

Résultats et choix protocolaire

A partir des données recueillies, le plateau de fluorescence est atteint à partir de 90 minutes (Figure 2.15 C). Nous avons choisi de retenir **120 minutes** d'incubation afin d'assurer l'atteinte du plateau de fluorescence car ce plateau n'était pas toujours atteint après 90 minutes pour certains individus testés. On notera que la fluorescence mesurée reste stable pendant au moins 60 minutes supplémentaires. L'observation des hémocytes marqués au DCF permet d'observer que la sonde est localisée de façon quasiment uniforme dans tout le cytoplasme des cellules (Figure 2.15 D).

II.6.2. Induction de l'activité oxydative

Pour stimuler l'activité oxydative des hémocytes, les cellules ont été placées en incubation avec du phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) aux concentrations de 0,5, 5 et 10 µg.mL^{-1}. Ce composé a pour effet d'activer certaines protéines kinases C impliquées dans l'activation des protéines NADPH oxydase (NOX) et de l'oxyde nitrique synthase (NOS) responsables de la production de ROS et RNS respectivement (Arumugam *et al.*, 2000)

Résultats et choix protocolaire

Les résultats indiquent que le PMA n'induit pas d'augmentation d'activité oxydative hémocytaire chez la dreissène (p = 0,084) quelle que soit la concentration en PMA testée (Figure 2.16 A, B). La méthodologie testée ne permet pas d'amplifier significativement l'activité oxydative hémocytaire qui sera donc étudiée à son niveau basal et non après stimulation par un composé. Cette absence de stimulation a déjà été

observé chez les mollusques, il a été suggéré que cette absence d'effet pouvait provenir d'une activation des hémocytes lors du prélèvement (Lambert *et al.*, 2003).

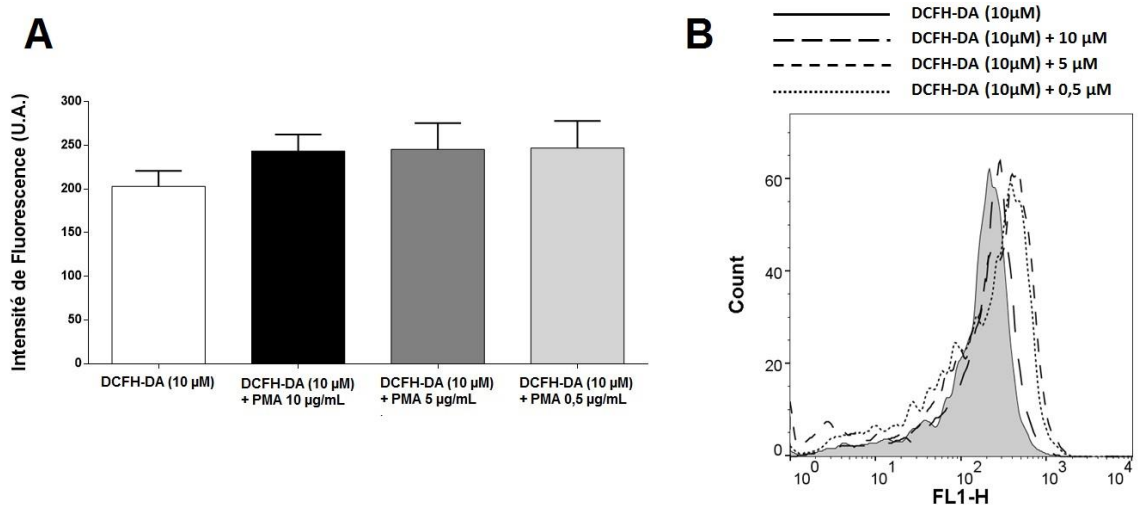


Figure 2. 16 : A : Mesure des effets de l'incubation des hémocytes avec du PMA sur l'activité oxydative par marquage au DCF en cytométrie de flux (BD FACScalibur). Les cellules sont placées en incubation avec le DCFH-DA (10 µM) et différentes concentrations en PMA pendant 120 minutes avant analyse (N = 6). B : Histogramme de fluorescences obtenus pour un même échantillon après incubation dans les différentes conditions testées.

II.7. Mesure du contenu en lysosomes

Les lysosomes sont des organites cellulaires impliqués dans la dégradation d'organites endommagés, de matériel phagocyté mais aussi dans la séquestration d'agents pathogènes et de polluants. Ils contiennent de nombreuses enzymes hydrolytiques actives à pH acide capables de dégrader toutes classes de macromolécules. Afin de détecter le contenu en lysosomes des hémocytes, nous avons retenu la sonde Lysotracker Red DND-99 (Figure 2.17 A). Ce produit diffuse librement au travers des membranes biologiques et possède une grande sélectivité pour les organites acides, notamment les lysosomes, dans lesquels il va s'accumuler. Cette sonde existe associée à différents fluorochromes et a été utilisée chez d'autres espèces de mollusques. D'après la littérature, des différences apparaîssent entre les protocoles utilisés (Tableau 2.5).

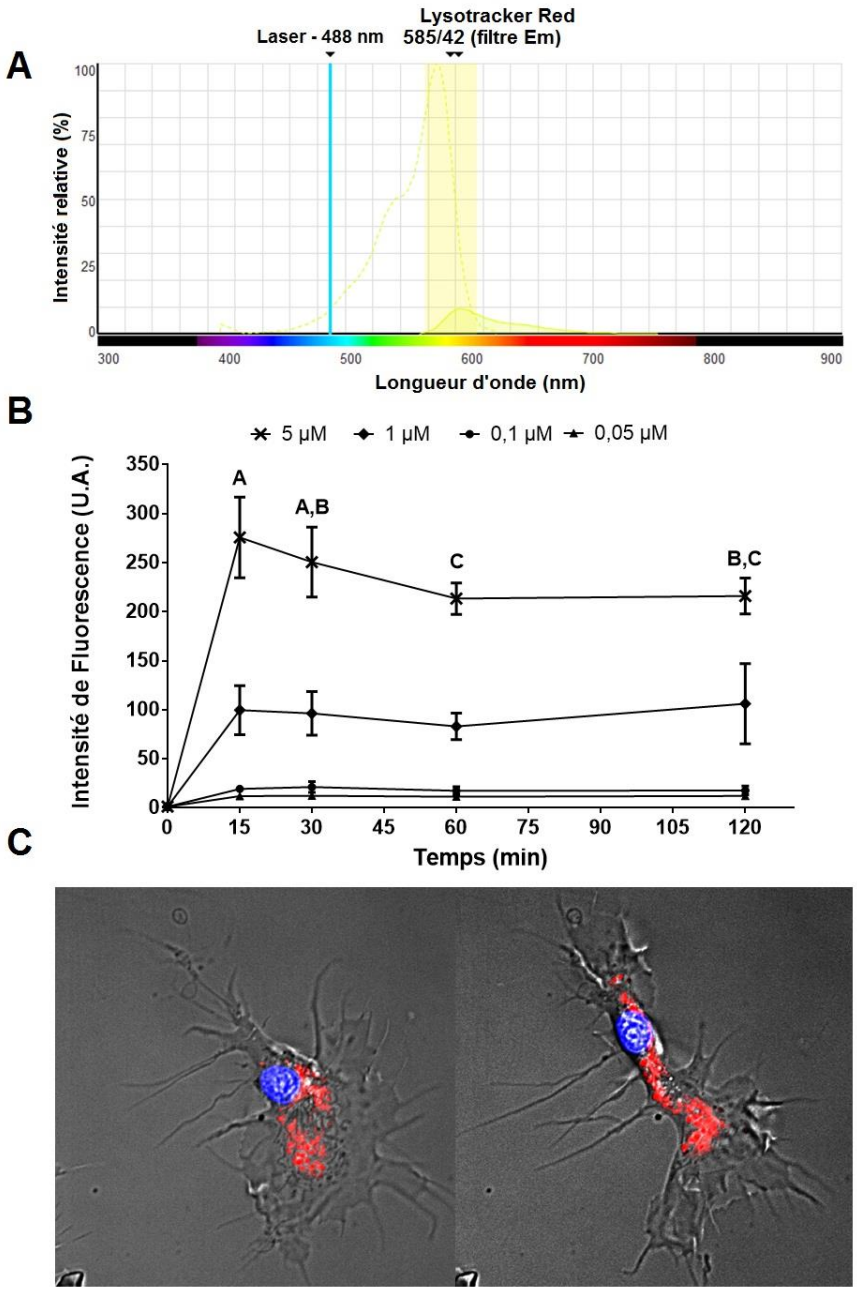


Figure 2. 17 : Optimisation du protocole de mesure du contenu en lysosomes avec la sonde Lysotracker Red DND-99. A : Spectre d'excitation (trait pointillé) et d'émission (trait plein) de fluorescence du Lysotracker Red après excitation par un laser de longueur d'onde 488 nm. B : Cinétique de marquage des hémocytes par 4 concentrations en Lysotracker Red (N=6, moyenne ± ET), l'intensité de fluorescence (Unité Arbitraire) émise par la sonde est mesurée en cytométrie de flux (BD FACScalibur). Les lettres indiquent les groupes homogènes pour chaque concentration et sont déterminés par le test de Tukey quand l'ANOVA indique des différences significatives ($p < 0,05$). C : Observation en microscopie confocale de cellules après 15 minutes d'incubation avec le Lysotracker à 1 µM (+ Hoechst 33342 10 µM).

Tableau 2. 5 : Différentes conditions de marquage observées dans la littérature utilisant la sonde Lysotracker afin d'étudier le contenu en lysosomes de cellules hémocytaires de mollusques.

Référence	Concentration	Temps d'incubation
Gagnaire *et al.*, 2006 b	5 µM	120 min
Bado-Nilles *et al.*, 2008	5 µM	120 min
Mateo *et al.*, 2009	0,05 µM	120 min
Donaghy *et al.*, 2010	1 µM	60 min
Donaghy *et al.*, 2011	1 µM	60 min
Latire *et al.*, 2012	10 µM	60 min
Wang *et al.*, 2012	2,5 µM	120 min
Jauzein *et al.*, 2013	1 µM	30 min
Moreau *et al.*, 2014	5 µM	120 min
Tame *et al.*, 2015	0,1 µM	60 min

II.7.1. Cinétique de marquage à plusieurs concentrations

Le fabriquant recommande d'utiliser la sonde à une concentration de 50 à 75 nM pour des lignées de vertébrés. A partir des protocoles tirés de la littérature, nous avons choisi de tester sur hémocytes de dreissènes les concentrations suivantes : 0,05 µM, 0,1 µM, 1µM et 5µM sur des durées comprises entre 0 et 120 minutes. Les échantillons sont analysés à chaque temps en cytométrie de flux et la fluorescence est recueillie en FL-2 (585/42 nm).

Résultats et choix protocolaire

D'après nos résultats, les concentrations de 0,05 et 0,1 µM n'entraînent pas une fluorescence suffisante pour une détection convenable (Figure 2.17 B). Bien que la fluorescence mesurée soit faible, elle est stable dès 15 minutes pendant 2 heures (ANOVA p = 0,868 pour 0,05 µM et p = 0,414 pour 0,1 µM). La concentration de 5 µM émet une forte fluorescence mais n'est pas stable dans le temps (ANOVA, p =

0,004) (Figure 2.17 B). On observe après 60 minutes une perte de fluorescence qui peut être liée à une alcalinisation des lysosomes par la sonde (Bado-Nilles *et al.*, 2013). La concentration de 1 µM atteint son maximum de fluorescence dès 15 minutes et reste stable dans le temps (ANOVA p = 0,526). Après observation au microscope confocal, il s'avère que le marquage est bien localisé dans le cytoplasme à proximité du noyau et permet la visualisation des organites (Figure 2.17 C). Nous avons choisi de retenir la concentration en Lysotracker de **1 µM** avec un temps d'incubation de **15 minutes**.

II.8. Mesure de l'activité mitochondriale

Les mitochondries sont des organites essentiels, sièges de la respiration cellulaire fournissant l'énergie permettant d'assurer le maintien des fonctions cellulaires. Afin de mesurer l'activité mitochondriale des hémocytes de dreissène, nous avons choisi d'utiliser la sonde Mitotracker Red CMXRos. La sonde fluorescente s'accumule spécifiquement dans les mitochondries actives en fonction de leur potentiel transmembranaire, reflétant ainsi leur activité. Bien que d'après le spectre d'excitation et d'émission du Mitotracker Red, la configuration optique des cytomètres utilisée ne permette a priori pas une excitation et une détection optimale de la sonde (Figure 2.18 A), la fluorescence émise après marquage et excitation à 488 nm des cellules était mesurable par les appareils.

II.8.1. Cinétique de marquage à plusieurs concentrations

Afin d'éviter le marquage d'autres structures cellulaires et limiter la surcharge des mitochondries par la sonde, le fabriquant recommande d'utiliser une concentration comprise entre 25 et 500 nM pour un temps d'incubation compris entre 15 et 45 minutes selon le modèle cellulaire. L'utilisation de ce produit est peu répandue mais Canesi et collaborateurs (2008) utilisent cette sonde sur hémocytes de moules bleue à une concentration finale de 50 nM et une incubation de 30 minutes. Nous avons fait le choix de tester la cinétique de marquage de cette même concentration ainsi que 100 nM. L'évolution de la fluorescente a été suivie pendant 120 minutes.

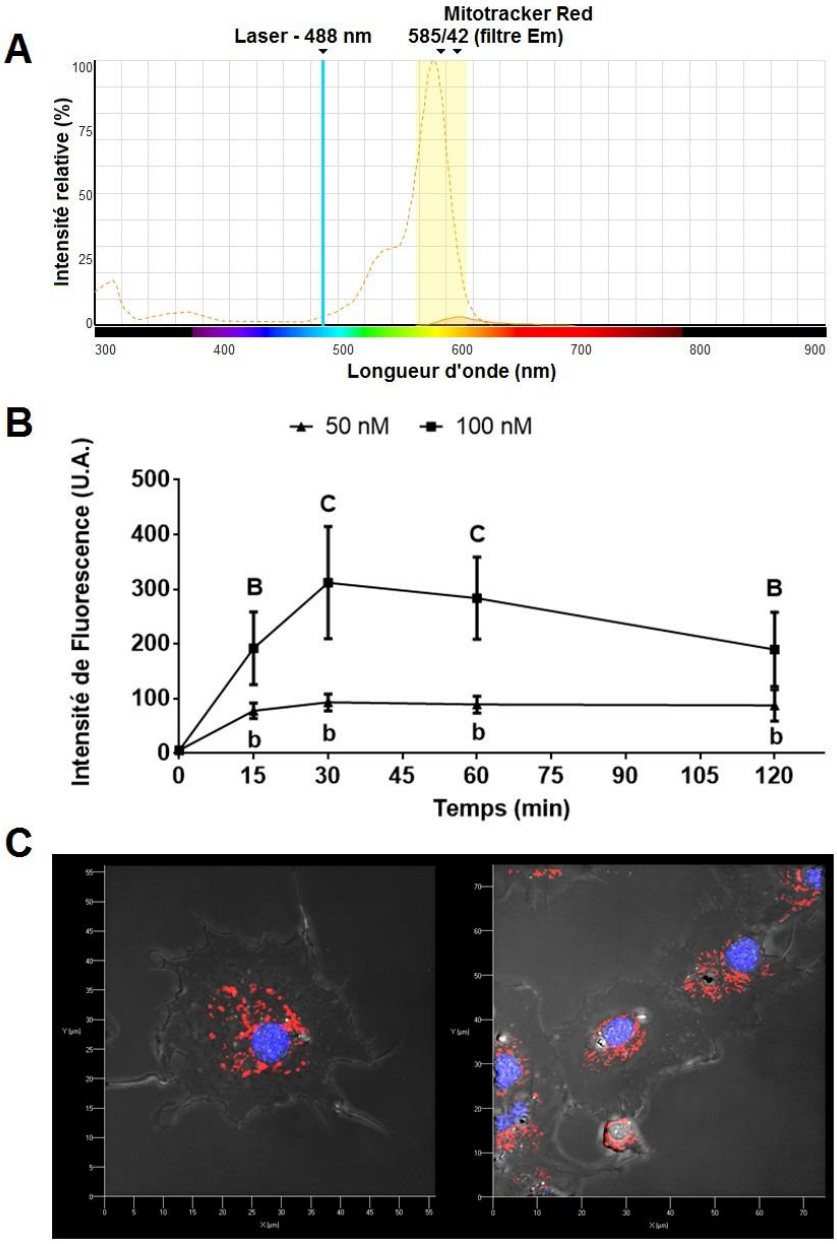


Figure 2. 18 : Mise au point du protocole de mesure de l'activité mitochondriale avec la sonde Mitotracker RED CMXRos. A : Spectre d'excitation (en pointillés) et d'émission (trait plein) de fluorescence du Mitotracker Red après excitation par un laser de longueur d'onde 488 nm. B : Cinétique de marquage des hémocytes par 2 concentrations en Mitotracker. L'intensité de fluorescence (Unité Arbitraire) émise par la sonde est mesurée en cytométrie de flux (BD FACScalibur). Les lettres indiquent les groupes homogènes pour chaque concentration et sont déterminés par le test de Tukey quand l'ANOVA indique des différences significatives (p < 0,05) (N=6, moyenne ± ET). C : Observations en microscopie confocale de cellules marquées avec 50 nM de Mitotracker pendant 15 min (+ Hoechst 33342 10 µM).

Les résultats obtenus indiquent qu'à 100 nM, la fluorescence détectée n'est pas stable dans le temps (Excluant T0, ANOVA, p = 0,027) (Figure 2.18 B). Ceci peut être dû à un relargage de la sonde suite à une accumulation trop importante dans les mitochondries. La concentration de 50 nM atteint son maximum de fluorescence dès 15 minutes et reste stable entre 15 et 120 minutes (ANOVA, p = 0,571) (Figure 2.18 B). L'observation d'hémocytes marqués avec cette concentration de Mitotracker en microscopie confocale indique que les mitochondries apparaîssent comme étant indépendantes et concentrées autour du noyau de la cellule (Figure 2.18 C). La concentration de **50 nM** et un temps d'incubation de **15 minutes** ont été retenus pour nos expérimentations.

III. Discussion

Cette partie a présenté le développement méthodologique réalisé afin d'analyser la viabilité hémocytaire ainsi que 4 marqueurs fonctionnels chez *Dreissena polymorpha* (activité de phagocytose, activité oxydative, contenu en lysosomes et activité mitochondriale). La mesure de l'ensemble de ces activités permet d'étudier les différents compartiments cellulaires autour du processus de phagocytose, depuis l'ingestion de particule étrangère, l'internalisation dans les lysosomes jusqu'à l'élimination par la production d'espèces réactives de l'oxygène. A partir des prélèvements d'hémolymphe chez la dreissène, il est possible de mesurer l'ensemble de ces marqueurs à l'échelle individuelle. Dans les chapitres suivants, ces marqueurs seront étudiés à l'échelle de chaque sous-populations hémocytaires afin de rendre compte des différences physiologiques existantes entre les types cellulaires ainsi que des variations de réponses dans différents contextes environnementaux. Une telle approche permettra ainsi une analyse plus fine de l'impact des stress environnementaux sur la physiologie hémocytaire. Les protocoles finaux employés dans nos études sont disponibles en Annexe 1. Des marqueurs liés à la structure des populations hémocytaires (concentration cellulaire et distribution des types hémocytaires) seront associés aux marqueurs fonctionnels pour mieux comprendre les changements physiologiques associés aux variations de fonctionnalités.

La mise au point des protocoles présentée dans ce chapitre permet de mesurer différentes fonctionnalités hémocytaires à des niveaux de base. Afin de valider la capacité de réponse de ces marqueurs, nous avons fait le choix, plutôt que de tester des inhibiteurs ou activateurs spécifiques à chaque activité, d'étudier les modulations des réponses suite à une exposition *ex vivo* au cadmium (Chapitre 4, partie 1).

D'un point de vu méthodologique, la mesure d'activité de phagocytose comme marqueur fonctionnel hémocytaire est une des plus répandue chez les mollusques. D'après les données de la littérature, on observe qu'un grand nombre de paramètres pouvant influencer la réponse mesurée varient entre les études. Bien que certains points de protocole comme le milieu de maintien des hémocytes ne puisse pas être standardisé entre les espèces, un effort doit être fourni afin d'harmoniser certains paramètres expérimentaux afin de pouvoir réaliser des études comparatives inter-laboratoires et inter-espèces avec ces tests. Un objectif à plus long terme serait de déterminer une méthodologie standard pour certains tests d'immunotoxicologie dans l'optique d'une normalisation d'une utilisation des résultats par les gestionnaires de l'environnement. Des initiatives ont été prises dans ce sens par le réseau franco-québécois d'écotoxicologie EcoBIM lors du projet HARMOBICYTE porté par la plateforme de cytométrie environnementale Mobicyte*. Cette étude inter-laboratoires avait pour but de déterminer les effets du cadmium sur la viabilité d'une lignée cancéreuse de monocytes humains (THP-1). Les résultats indiquent que l'étape d'acquisition des données entre les laboratoires est homogène mais des divergences apparaissent à l'étape analytique. Des travaux complémentaires devront être menés pour transposer les tests sur des modèles de populations cellulaires hétérogènes et en se focalisant sur des marqueurs fonctionnels.

*Plateau technique Mobicyte : UMR_I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO Unité Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques

E-mail : mobicyte@univ-reims.fr

Chapitre 3: Caractérisation des populations hémocytaires et leurs fonctionnalités : modulations induites par la ponte

Une première étude réalisée en 1996 par Giamberini et collaborateurs s'est attachée à identifier les populations hémocytaires circulantes chez la dreissène. Sur la base de colorations histologiques, 3 types hémocytaires ont été identifiés :

- Le premier type hémocytaire regroupe des hémocytes granulaires possédant des granulations cytoplasmiques neutrophiles d'environ 2µm (Figure 3.1 A). Ces cellules sont caractérisées par un faible ratio nucléo-cytoplasmique et émettent de nombreux filopodes après étalement. Ils constituent environ 34% des hémocytes.
- Une population composée d'hémocytes agranulaires ou hyalinocytes, caractérisés par un cytoplasme légèrement basophile dénué de granulations et possédant peu de vacuoles (Figure 3.1 B). Ce type cellulaire possède un noyau large et ne produit que peu de filopodes. Cette population a été observée comme étant majoritaire et représente environ 40% du nombre de cellules totales.
- Le troisième type cellulaire observé est représenté par de grands hémocytes basophiles qui ont été dénommés LBH pour « Large Basophilic Hemocytes ». Ils sont caractérisés par la présence de quelques granules à affinité basophiles et de nombreuses vacuoles (Figure 3.1 C). Ce type cellulaire possède un volume cytoplasmique très supérieur aux hyalinocytes et représente environ 26% des hémocytes totaux.

Cette étude a également mis en évidence la présence au sein des granulocytes et des LBH de phosphatases acides et d'estérases mais de façon hétérogène dans ces cellules. Par ailleurs, l'activité glucuronidase est détectée uniquement dans les LBH.

Dans les travaux de thèse du même auteur, le terme de hyalinocyte est utilisé pour regrouper la population de hyalinocytes et les « LBH ». Il est décrit que la taille des cellules peut varier de 20 à 50 µm et que les cellules les plus petites possèdent un noyau entouré par très peu de cytoplasme. Il est suggéré que ces cellules seraient des cellules jeunes qui pourraient être considérées comme étant des prohyalinocytes (Giamberini 1993).

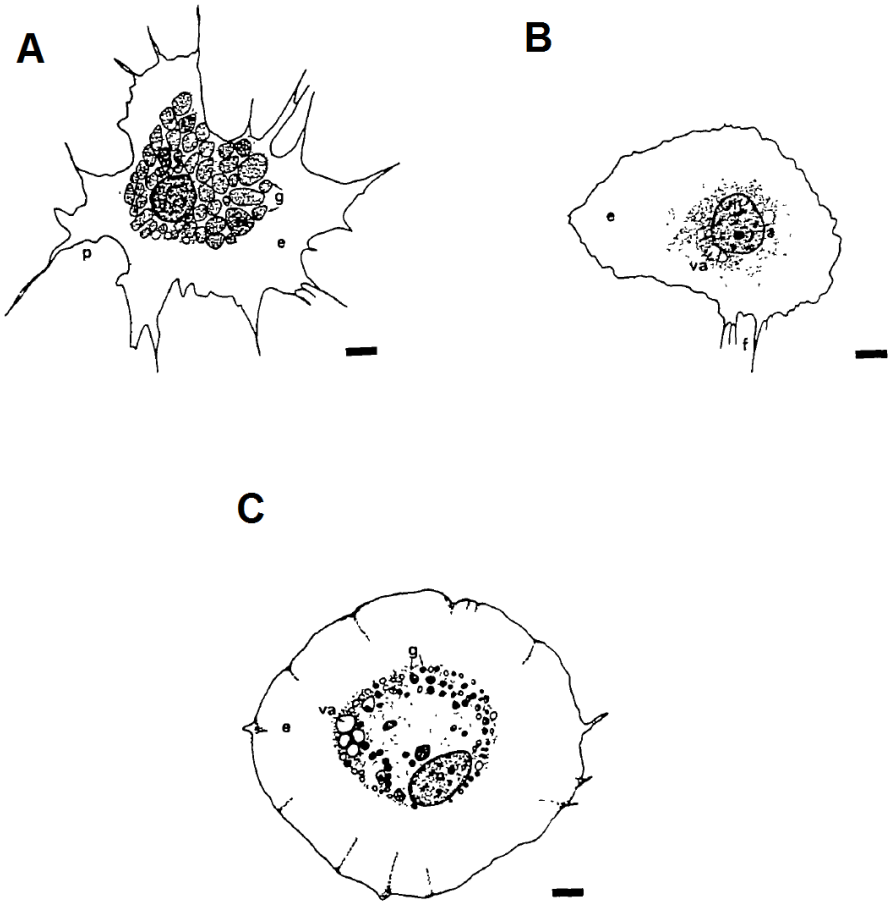


Figure 3. 1 : Types hémocytaires observés chez la moule zébrée *Dreissena polymorpha*. A : Granulocyte ; B : Hyalinocytes ; C : Grand hémocyte basophile. La bar d'échelle représente 2 µm (Tiré de Giamberini *et al.*, 1996).

Outre la détection de ces activités enzymatiques, les fonctionnalités hémocytaires de la moule zébrée n'ont jamais été étudiées. Ce chapitre est constitué d'un article intitulé « Functional features of hemocyte subpopulations of the invasive mollusk species *Dreissena polymorpha* » soumis pour publication dans la revue « **Fish & Shellfish Immunology** » et vise à combler ce manque. Lors de cette étude, les populations hémocytaires présentes en circulation chez la moule zébrée ont été caractérisées par une combinaison d'analyses structurales et fonctionnelles. L'analyse a été mise en place lors de la période de gamétogenèse et lors de la période de pleine ponte des

individus, ce qui constitue deux périodes contrastées d'un point de vue physiologique, dans l'objectif de déterminer si ces processus entraînent des modulations des fonctions hémocytaires. La coloration histologique de cellules adhérées a permis l'observation de trois types hémocytaires identifiés en tant que hyalinocytes et hémocytes blastes pour les cellules agranulaires et des granulocytes pour les cellules granulaires. En période de gamétogenèse, les hyalinocytes représentent plus de 44% des cellules et constituent le type hémocytaire majoritaire. L'utilisation de la technique de cytométrie de flux a également permis de détecter la présence de trois populations cellulaires. Nous avons pu établir les correspondances entre les types hémocytaires observés en microscopie et l'analyse en cytométrie de flux suite à l'utilisation d'un cytomètre trieur de cellules.

L'analyse des fonctionnalités cellulaires (développée dans le chapitre 2) indique que les hémocytes de type blaste présentent un fort rapport nucléocytoplasmique, ne sont pas phagocytaires et possèdent de faibles activités oxydative, mitochondriale et peu de lysosomes. Ces caractéristiques sont décrites dans la littérature comme correspondant à un type cellulaire précurseur.

Les résultats obtenus pour les hyalinocytes et les granulocytes indiquent que ces deux types hémocytaires sont équipés notamment pour réaliser la réponse immunitaire innée. Les hyalinocytes présentent une activité oxydative supérieure à celle analysée pour les granulocytes. Une telle observation n'est pas commune et de nombreuses études indiquent que les granulocytes constituent généralement le type cellulaire le plus actif. Ces résultats démontrent l'importante variabilité fonctionnelle des populations hémocytaires. Ceci suggère également que les résultats des analyses en lien avec les activités hémocytaires peuvent être fortement dépendantes des conditions expérimentales mises en place.

Nos résultats indiquent également que la période de ponte chez *Dreissena polymorpha* est associée à une augmentation de la proportion en hyalinocytes ainsi qu'à de faibles niveaux d'activités hémocytaires. Cette réduction d'activité hémocytaire semble mettre en évidence des changements physiologiques importants en période de ponte chez cette espèce connue pour son fort potentiel reproducteur.

Article 1: Functional features of hemocyte subpopulations of the invasive mollusk species *Dreissena polymorpha.*

Evariste Lauris [a,b], Auffret Michel [c], Audonnet Sandra [d], Brousseau Pauline[b], Geffard Alain [a], David Elise [a], Fournier Michel [b], Betoulle Stéphane [a]

[a] Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR_I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO Unité Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques, UFR Sciences Exactes et Naturelles, 51687 Reims Cedex 2, France

[b] INRS, Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

[c] Institut Universitaire Européen de la Mer, LEMAR UMR CNRS 6539, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

[d] Université de Reims Champagne-Ardenne, URCACyt – Plateau technique de cytométrie en flux, UFR Sciences Exactes et Naturelles, 51687 Reims Cedex 2, France

Abstract

Dreissena polymorpha is a mussel species that invaded many lotic and lentic inland waters in Western Europe and North America. Its positive or negative interactions with biotic and abiotic components of ecosystems are numerous, making this bivalve the subject of numerous studies in ecology, ecophysiology and ecotoxicology. In these contexts, the functional characterization of the zebra mussel hemocytes is of particular interest, as hemocytes are central cells involved in vital functions (immunity, growth, reproduction) of molluscan physiology.

Dreissena polymorpha circulating hemocytes populations were characterized by a combination of structural and functional analysis. Assessments were performed during two contrasted physiological periods for mussels (gametogenesis and spawning). Three hemocyte types were identified as hyalinocytes and blast-like cells for agranular hemocytes and one granulocyte population. Flow cytometry analysis of hemocytes functionalities indicated that blast-like cells were non phagocytic cells with low oxidative and mitochondrial activities and low lysosomal content. Hyalinocytes and granulocytes are fully equipped to perform innate immune response. Hyalinocytes exhibit higher phagocytic and oxidative activities than those analyzed for granulocytes. Such observation is not common since numerous studies show that granulocytes are usually

cells that have the highest cellular activities. This result demonstrates the significant functional variability of hemocyte subpopulations. This may be highly dependent on the experimental conditions used by researchers in functional analysis related to phagocytosis and cellular oxidative activity. Moreover, our findings reveal that spawning period of *Dreissena polymorpha* was associated with an increase of hyalinocyte percentage in relation to low levels of biological activities in hemocytes. This reduction in hemocyte activity would reflect the important physiological changes associated with the spawning period of this invasive species known for its high reproductive potential.

Keywords
Zebra mussel, invasive mollusk, hemocytes, phagocytosis

I. Introduction

The zebra mussel, *Dreissena polymorpha* is a freshwater bivalve mollusk native from Ponto-Caspian region that successfully colonized Western Europe in early 19th century and North-America in late 1980 (Hébert *et al.*, 1989 ; Mackie *et al.*, 1989). Biology and population dynamics of this species were extensively studied due to its invasive status (Morton 1969a, 1969b; Borcherding 1991; Nalepa 1993; Ackerman *et al.*, 1994; Mackie & Schloesser 1996; Mcmahon 1996; Chase & Bailey 1999). In freshwater systems, this species is known to threaten unionid mussel populations and to impact ecosystems mainly by biofouling and lowering phytoplanktonic biomass (Mackie 1991; Schloesser *et al.*, 1991; Mackie & Schloesser 1996; Caraco *et al.*, 1997). Moreover, this zebra mussel is the first intermediate host of trematode *Bucephalus polymorphus* that pathologically affects cyprinidae (Molloy *et al.*, 1997; Lajtner *et al.*, 2008). In another point of view, zebra mussel settlements can provide habitat for other species after biodeposition and may alter water quality through filtration process (Gergs *et al.*, 2009; Strayer 2009; McLaughlan & Aldridge 2013). Moreover, in environmental sciences, dreissenids were used as biofilters to remove human pathogens, some micropollutants and to reduce toxicity of urban wastewaters (Graczyk *et al.*, 2003; Binelli *et al.*, 2014, 2015). Transplanted or natural populations of zebra mussels were also used as sentinel

species for freshwater pollution monitoring (de Lafontaine *et al.*, 2000; Minier *et al.*, 2006; Parolini *et al.*, 2010). Thus, studying physiology of this mussel is particularly relevant in relation to the numerous environmental problematics which implicate this species.

Hemocytes are hemolymphatic circulating cells with tissue infiltration capacities. These cells are implicated in bivalve homeostasis through involvement in numerous physiological functions such as nutrient digestion and transport (Pollero *et al.*, 1985; Beninger *et al.*, 2003), tissues and shell repair (Suzuki *et al.*, 1991; Mount *et al.*, 2004), detoxication and immune defenses (Cheng 1981; Giamberini *et al.*, 1996; Matozzo *et al.*, 2001). Mollusc immunity relies exclusively on innate immunological mechanisms through humoral and cell-mediated responses insured by hemocytes. Hemocyte functions related to immune defense are of particular interest for organism integrity preservation.

As other bivalve species, zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, possess circulating hemocytes which were described microscopically, highlighting presence of three circulating cell types as neutrophilic granulocytes, hyalinocytes and large basophilic hemocyte whose cellular functions remain unstudied (Giamberini *et al.*, 1996). In mollusk species, two main hemocyte types are generally accepted as granular hemocytes (granulocytes) containing intracytoplasmic granules and agranular hemocytes (Cheng 1981, Auffret 1988; Hine 1999; Donaghy *et al.*, 2009b). However, origin of hemocytes and process leading to cell subtypes remains unknown. Hemocytes may come from the same cell lineage and the different hemocyte types may be related to differences in cell maturation stages with probably different functions (Cheng 1981; Rebelo *et al.*, 2013). Moreover, implications of such cell subpopulations in physiological process are not completely understood.

Flow cytometry allow rapid quantitative analysis of single cells morphological and functional parameters. It is a performant tool that has been successfully used to improve knowledge on molluscan immunity (Ford *et al.*, 1994; Ashton-Alcox & Ford 1998; Renault *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2001; Hégaret *et al.*, 2003; Goedken & De Guise 2004; Donaghy *et al.*, 2009b). Most of studies concerning bivalve hemocytes functionalities focus on marine species due to their high economic value while less is known about

freshwater species benefiting, for part of them, protection status. However, zebra mussels are not protected and may constitute a model species of interest according to its highly invasive characteristics. From an ecological point of view, it is important to improve knowledge on physiological responses of this species and their modulations by ecological factors.

The aim of the study was to characterize *Dreissena polymorpha* hemocytes populations by a combination of structural and functional analysis during two distinct and crucial physiological periods for mussels (gametogenesis and spawning). Such characterization may constitute a master data to improve our ecophysiological knowledge of this freshwater invasive mussel.

II. Materials and methods

II.1. Animals and hemolymph collection

Zebra mussels were collected by divers at Lac du Der (Marne, France). In laboratory, mussels were maintained 2 weeks before experiment in aerated tanks filled with natural spring water. Mussels were fed with *Chlorella vulgaris* ($1x10^6$ cells.day^{-1}.mussel^{-1}). Animals were sampled during two contrasted periods: March (gametogenesis period; mussel length: 25.8 ± 2mm; weight: 1223 ± 324mg) and May 2015 (spawning period; mussel length: 25.6 ± 2.5mm; weight: 1289 ± 412mg) (Palais *et al.*, 2011). Mussels were maintained at 12°C or 16°C respectively in accordance with field water temperatures. Hemolymph was withdrawn from adductor muscle using 0.5 mL insulin syringes fitted with 29G needles. Hemolymph was withdrawn from each individual and stored in sterile tubes.

II.2. Morphometric characterization of hemocyte subpopulations

II.2.1. Hemocytes cytology

Withdrawn hemocytes were settled on glass slide for 30 minutes at 4°C to prevent clumping. Cells were then incubated for 15 min at room temperature to allow adhesion on glass slide. Cells were fixed with methanol prior staining with Hemacolor kit (Merck) according to manufacturer's recommendations. Stained slides were observed under light microscope and hemocytes sub-types were characterized according to their morphological features and tinctorial properties. Cytoplasm and nucleus diameter measurements were performed on adherent cells using image analysis software ImageJ 1.47v.

II.2.2. Flow cytometric analysis of hemocyte populations

For flow cytometry assessments, fresh hemocytes were diluted to $2x10^5$ cells/mL with Leibovitz's L-15 medium modified for zebra mussels according to (Quinn *et al.*, 2009) with some modifications (L-15 medium (15% v/v), distilled water (85% v/v), HEPES 10 mM, L-Glutamine 2 mM, Penicillin 100 IU/mL, Streptomycin 100 µg/mL, pH 7.5, 0.2 µm filtered). Flow cytometry data files were analyzed using FlowJo v10 (Tree Star) software.

Hemocyte sub-populations were stained using SYBR®-Green I (Invitrogen, Life technologies), a membrane permeable probe with high affinity for nucleic acid that preferentially binds to double stranded DNA. Briefly, 250µL of hemocyte suspension containing $0.5x10^5$ cells were incubated in dark with SYBR-Green I (10x final concentration) for 120 min at 16°C. Cell fluorescence emissions were analyzed with FACScalibur (Becton Dickinson) flow cytometer (FL-1 channel, 530nm). Measures were performed on individual samples and hemocyte sub-types were distinguished according to their morphological parameters, forward scatter (FSC-H) for particle size and side scatter (SSC-H) for internal complexity.

II.2.3. Cell sorting

Cell sorting analysis were performed using BD FACSAria II flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with a 488 nm laser. Hemolymph samples of five mussels were pooled in order to sort 50,000 cells per sub-type. Samples were passed through an 85 µm nozzle. Sorting purity was adjusted to the Yield Mask setting. Forward- and side-scatter (FSC-H and SSC-H) were used for determination of cell size and granularity. Cytocentrifugation (580 RPM for 1 min) using Cytospin 4 (Thermo scientific), was performed after cell sorting and hemocyte monolayers were stained with Hemacolor kit (Merck) for light microscopy observations.

II.3. Functional characterization of hemocytes subpopulations

Hemocytes functional parameters were performed using Accuri™ C6 (Becton Dickinson) flow cytometer. BD Accuri™ C6 software (v1.0.264.21) was used to analyze data files. Subsequent analysis were performed on individual samples from 20 mussels per sampling period (March and May).

II.3.1. Hemocyte distribution and mortality

Cell subtypes were separated according to their autofluorescence light scattering parameters (FSC-H versus SSC-H dotplots). Cell mortality was evaluated using propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich) at 10 µg/mL final concentration and analyzed immediately by flow cytometry for fluorescence in FL-3 channel (670 nm). Membrane of viable cells does not allow PI to penetrate on contrary to dead cells with injured membrane that are permeable to the probe emitting red fluorescence when bound to DNA.

II.3.2. Phagocytosis

The phagocytic activity was measured using 2µm diameter yellow-green fluorescent latex microspheres (Brousseau *et al.*, 1998) (Fluoresbrite®, PolyScience). Hemocytes

were incubated in modified L15 (Quinn *et al.*, 2009) in the dark for 18h at 16°C with a 1:100 hemocyte-beads ratio prior flow cytometric analysis measuring fluorescence in FL-1 channel (533/30). Results are expressed as percentage of phagocytic hemocytes corresponding to cells that engulfed at least three fluorescent beads and the mean number of engulfed beads per phagocytic cell was calculated (total fluorescence divided by fluorescence of one bead).

II.3.3. Oxidative activity

Evaluation of basal intra-cellular reactive oxygen species (ROS) production was performed using 2′,7′-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA; Sigma-Aldrich) as a probe. The nonfluorescent probe freely diffuses into cells. Probe is de-esterified by intracellular esterase and is converted to green-fluorescent molecule (DCF) when oxidized by ROS (Lambert et al., 2003). Hemocytes were incubated with DCFH-DA for 120 min at 16°C in dark before processing flow cytometry analysis. Relative intracellular oxidative activity is expressed as mean fluorescence intensity (MFI; FL-1 channel 533/30 nm) in arbitrary units (A.U.)

II.3.4. Lysosomal content

Relative number of lysosome in cells was measured using Lysotracker Red DND-99 (Invitrogen, Life technologies), a fluorescent dye that accumulate specifically in acidic organelles. Cells were incubated in the dark with probe at 1 µM final concentration for 15 min at 16°C. Relative lysosomal content is expressed as mean fluorescence intensity (MFI; FL-2 channel 585/40 nm) in arbitrary units (A.U.).

II.3.5. Mitochondrial activity

Cytosolic mitochondrial activity was evaluated using Mitotracker Red CMXRos (Invitrogen, Life technologies) a specific fluorescent probe which integrates mitochondria according to its membrane potential. Hemocytes were incubated in the dark for 15 min

with 50 nM final concentration at 16°C. Relative mitochondrial activity is expressed as mean fluorescence intensity (MFI; FL-2 channel 585/40 nm) in arbitrary units (A.U.).

II.4. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with Minitab software version 16.1.1.0. Data were tested for normality with Kolmogorov-Smirnov test and homogeneity of variances with Levene test. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test were used to compare hemocyte sub-type parameters. Differences between two seasonal periods were evaluated for each cell type using Student's t-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$. All results are presented as mean ± standard deviation.

III. Results

III.1. Morphometric characterization of hemocytes

According to cytological observations, three types of circulating hemocytes could be identified after Hemacolor staining (Figure 3.2). *Dreissena* hemolymph contained hyalinocytes and blast-like cells for agranular hemocytes and one granulocyte population. Hyalinocytes were large spread cells characterized by a cytoplasm that did not retained histological dye (Figure 3.2). Hyalinocytes expressed some cytoplasmic vacuoles and emitted filopodia. Blast-like hemocytes were small cells with slightly basophilic cytoplasm. Granulocytes were large spread cells emitting filopodia and containing numerous eosinophilic granules. Hyalinocytes cytoplasmic and nucleus sizes (25.82 ± 5.06 µm and 8.85 ± 2.25 µm respectively) were significantly higher than those of granulocytes (22.92 ± 3.96 µm and 5.06 ± 1.14 µm ; $p < 0.001$) (Table 3.1). Blast-like hemocytes were the smallest cell type (10.38 ± 2.26 µm) with an intermediate nucleus size (6.13 ± 1.55 µm). Nucleo-cytoplasmic ratio was significantly higher for blast-like cells (0.6 ± 0.14) than hyalinocytes (0.35 ± 0.11). Eosinophilic granulocytes exhibited the lowest N/C value (0.23 ± 0.06).

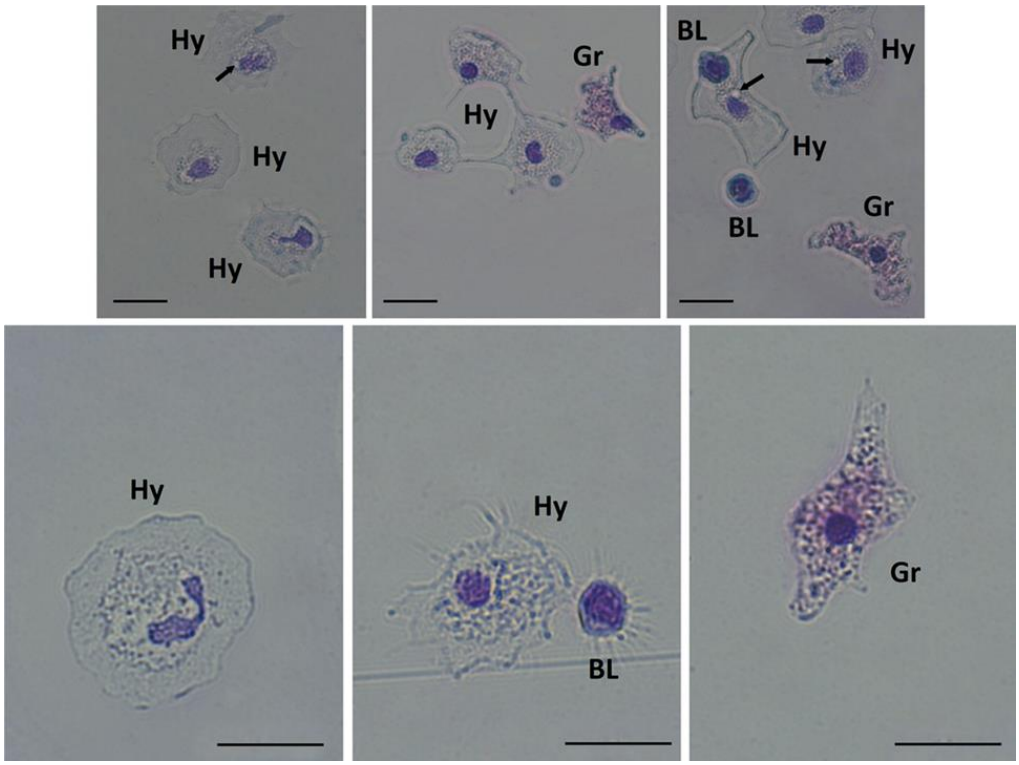


Figure 3. 2 : Light micrographs of adherent hemocytes from *Dreissena polymorpha* after fixation and staining. Agranular cells include hyalinocytes (Hy) exhibiting vacuolated cytoplasm (arrow) and small hemocytes: blast-like cells (BL). Granulocytes (Gr) include hemocytes exhibiting eosinophilic granules and cytoplasm. Bar = 20µm.

Tableau 3. 1 : Cytological characterization of *Dreissena polymorpha* circulating hemocytes. Diameter measurements were performed on adherent cells. Values are presented as mean ± standard deviation. Letters indicate significant differences between hemocytes populations (ANOVA p <0.05 followed by Tukey test).

	N	**Cell diameter (µm)**	**Nucleus diameter (µm)**	**N/C Ratio**
Hyalinocytes	143	$25.82^{A} \pm 5.06$	$8.85^{A} \pm 2.25$	$0.35^{A} \pm 0.11$
Granulocytes	67	$22.92^{B} \pm 3.96$	$5.06^{B} \pm 1.14$	$0.23^{B} \pm 0.06$
Blast-like	68	$10.38^{C} \pm 2.26$	$6.13^{C} \pm 1.55$	$0.60^{C} \pm 0.14$

Flow cytometric analysis allowed identification of three hemocyte populations from SYBR Green positive cell density-plot (Figure 3.3 A) according to their relative size (FSC-H) and internal complexity (SSC-H). After cell sorting and staining, population with significantly higher complexity (385.87 ± 8.12 A.U.) appeared to be eosinophilic granulocytes (P2, Figure 3.3 B) whereas smallest cells (153.37 ± 10.93 A.U.) with lowest internal complexity were blast-like cells (P3, Figure 3.3 B). Hyalinocytes (P1, Figure 3.3 B) were larger cells (564 ± 15.27 A.U.) with intermediate internal complexity (89.7. ± 2.94 A.U.).

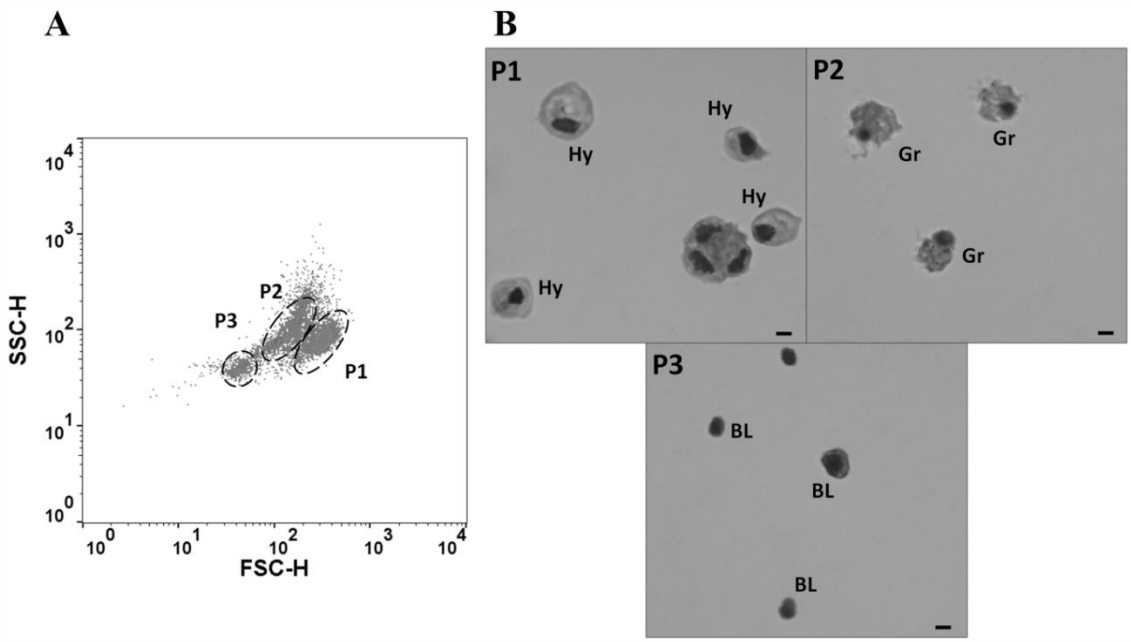


Figure 3. 3 : Flow cytometric analysis of *Dreissena polymorpha* hemolymph. A: SYBR Green I positive cells according to their relative cytometric size (FSC-H) and complexity (SSC-H). B: Morphology of cells after sorting, cytocentrifugation and staining with Hemacolor. P1, P2, P3 = Population 1, 2, 3; Hyalinocytes (Hy), Granulocytes (Gr), Blast-Like cells (BL), Bar = 10 µm.

III.2. Functional characterization of hemocytes subpopulations

3.2.1. Hemocyte counts, distributions and mortality

Mean hemocyte count in hemolymph were 1.04 ± 0.24 x10^6 cell.mL^{-1} during gametogenesis period and was not significantly different from spawning period (1.22 ± 0.66 x10^6 cell.mL^{-1}) (p =0.253). Mean percentage of dead cells was 19.8 ± 6.43% during gametogenesis period and was not significantly different from spawning period (16.37 ± 5.66% ; p =0.081). During gametogenesis, hyalinocytes were the main accounted cell population with about 45% of total cells whereas blast-like hemocytes and granulocytes 30% and 25% of total hemocytes respectively (Table 3.2). During spawning period, percentage of hyalinocytes was significantly increased compared to those observed during gametogenesis period, reaching about 68% of total cells (p <0.001). Reduction of blast-like cells and granulocytes percentage were observed between the two sampling period, decreasing to about 20% (p =0.003) and 12% (p <0.001) respectively (Table 3.2).

Tableau 3. 2 : Hemocyte counts, distribution and mortality during gametogenesis and spawning period. Values are presented as mean ± standard deviation (SD). Asterisks indicate significant differences among two periods for each parameter (t-test **: p < 0.01; ***: p <0.001).

	N	Gametogenesis period	Spawning period
Cell concentration (x10^6 cell.mL^{-1})	20	1.04 ± 0.24	1.22 ± 0.66
Cell mortality (%)	20	19.8 ± 6.43	16.37 ± 5.66
Hyalinocyte (%)	20	44.72 ± 16.77	68.05*** ± 12.19
Granulocyte (%)	20	24.98 ± 8.45	11.81*** ± 3.86
Blast-like (%)	20	30.3 ± 10.10	20.14** ± 9.8

3.2.2. Phagocytic activity

A phagocytic activity was detected during the two periods only in hyalinocytes and granulocytes but not in blast-like hemocytes (figure 3.4 A-D). Percentage of cells that engulfed at least three beads was significantly higher for hyalinocytes than granulocytes ($p < 0.001$) during gametogenesis and spawning periods (figure 3.4 E). For both cell type, activity was significantly lower during spawning period (Hyalinocytes: $p < 0.001$; Granulocytes: $p = 0.03$). Mean number of engulfed beads was not significantly different between hyalinocytes and granulocytes during gametogenesis period (Hyalinocytes: 13.92 ± 2.39; Granulocytes: 16.19 ± 4.92 ; $p = 0.075$) while mean number of beads was significantly lower for granulocytes during spawning period ($p < 0.001$). Significantly lower numbers of beads were engulfed during spawning period for hyalinocytes and granulocytes decreasing to 11.1 ± 2 and 3.5 ± 1.1 respectively ($p < 0.001$) (Figure 3.4 F).

3.2.3. Hemocytes oxidative activity

During the two sampling periods, basal oxidative activity in hemocytes was significantly higher for hyalinocytes than granulocytes and was lower for blast-like cells (Figure 3.5 A). During spawning period, basal reactive oxygen species production significantly decreased for hyalinocytes ($p < 0.05$) and granulocytes ($p < 0.01$) whereas it remained unchanged for blast-like cells ($p = 0.157$) (Figure 3.5 B).

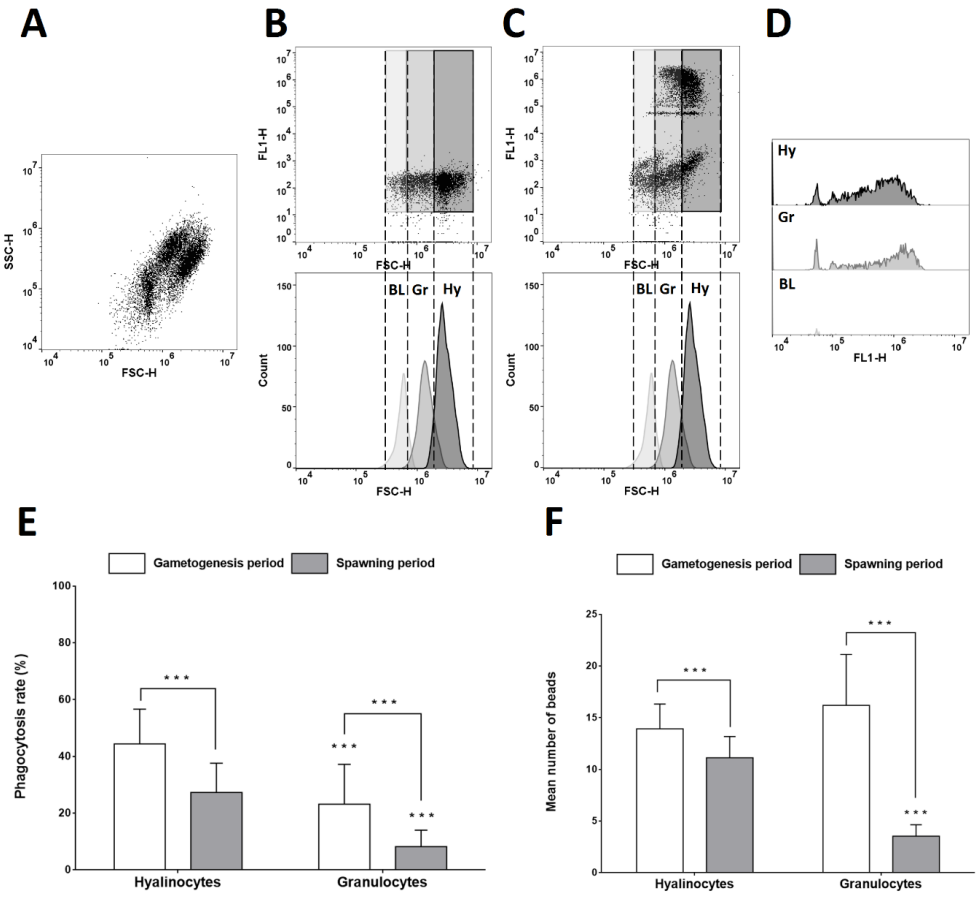


Figure 3. 4 : Comparison of hemocyte type phagocytic activity measured by flow cytometry during gametogenesis and spawning period. Hemocytes types are differentiated based on size repartition of each cell type. A: Relative size (FSC-H) against relative internal complexity (SSC-H) of hemocytes populations without fluorescent beads. B: Relative size (FSC-H) against green fluorescence (FL1-H) dot plot of hemocytes populations before incubation with fluorescent beads. C: Relative size (FSC-H) against green fluorescence (FL1-H) dot plot of hemocytes populations after 18h incubation with fluorescent beads. D: Fluorescence of phagocytic hemocytes measured for each cell population. Hy: Hyalinocytes, Gr: Granulocytes, BL: Blast-like hemocytes. E-F: Comparison of phagocytic rate and mean number of beads phagocyted by hyalinocytes and granulocytes during gametogenesis and spawning period. Asterisks indicate significant differences among two cell populations and periods for each parameter (t-test ***: p <0.001).

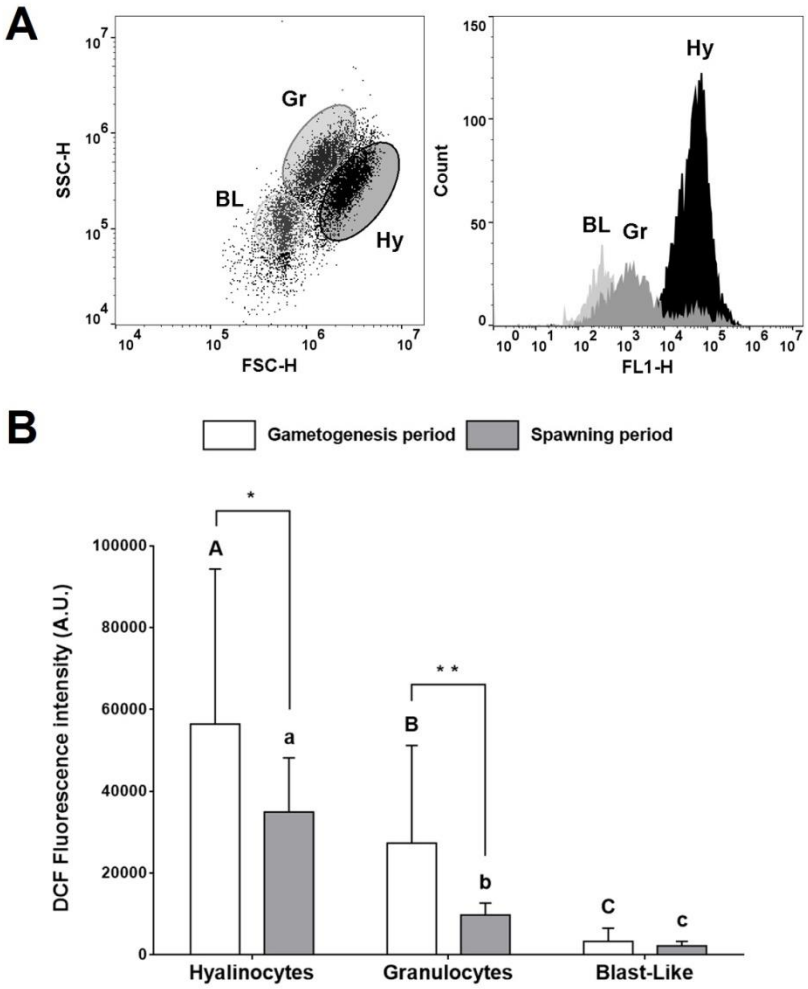


Figure 3. 5 : Basal oxidative activity in *Dreissena polymorpha* hemocyte populations during gametogenesis or spawning period. A: Relative size (FSC-H) against relative internal complexity (SSC-H) of hemocytes populations (left) and histogram of DCF fluorescence for each cell population (right). B: Mean oxidative activity analyzed for each cell population for the two sampling periods. Hy: Hyalinocytes, Gr: Granulocytes, BL: Blast-like hemocytes. Capital letters indicate significant differences between hemocytes (ANOVA p <0.05 followed by Tukey test) populations for gametogenesis period, letters in lowercase indicate significant differences between hemocytes populations for spawning period. Asterisks indicate significant differences among two periods for each parameter (t-test *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

3.2.4. Hemocytes lysosomal content

The relative number of lysosomes was significantly higher (p <0.001) for granulocytes (22,027 ± 10,346 A.U.) compared to hyalinocytes (16,041 ± 5,918 A.U.) and blast-like

cells (2,956 ± 1,382 A.U.) during gametogenesis period. Mean fluorescence was significantly higher for all hemocyte types during spawning period compared to gametogenesis period and hyalinocytes have significantly higher (p <0.001) relative lysosomal content than granulocytes (Figure 3.6 A).

3.2.5. Mitochondrial activity

Mitochondrial activity was significantly higher for granulocytes (27,536 ± 11,870 A.U.) than hyalinocytes (17,542 ± 8,855 A.U.) and both fluorescence levels decreased during spawning period (5,416 ± 2,395 and 3,681 ± 1,570 A.U. respectively). Blast like cells exhibited low mean fluorescence and remained at the same level at both periods (p = 0.172 ; Figure 3.6 B).

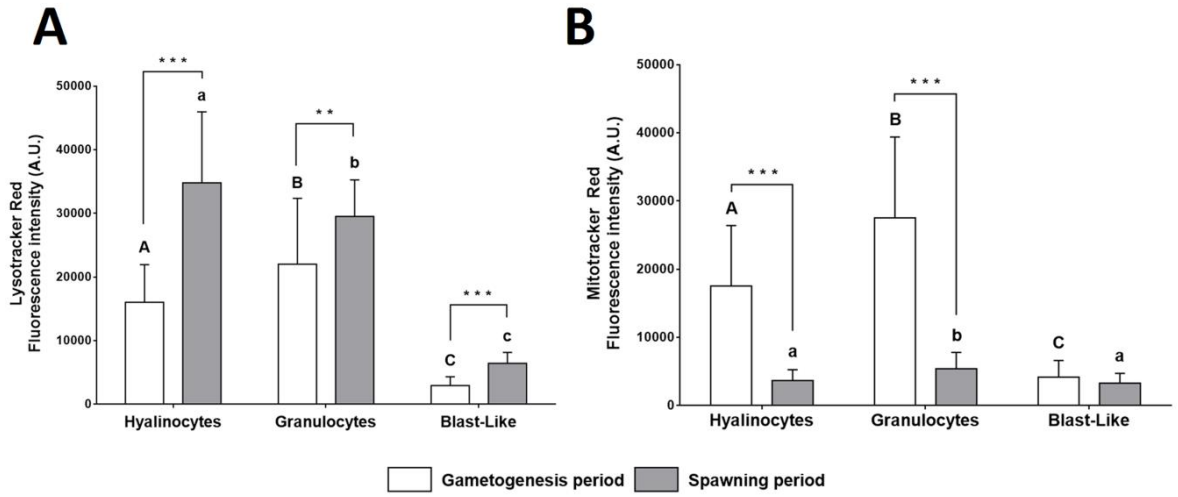


Figure 3. 6 : Functional parameters from *Dreissena polymorpha* hemocyte populations during gametogenesis and spawning period. A: Relative lysosomal content, B: Mitochondrial activity. Values are presented as mean ± standard deviation (SD). Capital letters indicate significant differences between hemocytes (ANOVA p <0.05 followed by Tukey test) populations for gametogenesis period, letters in lowercase indicate significant differences between hemocytes populations for spawning period. Asterisks indicate significant differences among two periods for each parameter (t-test **: p < 0.01; ***: p <0.001).

IV. Discussion

In this study, light microscopy allowed identification of three hemocytes morphotypes: agranular hemocytes regrouping blast-like cells and hyalinocytes and granular hemocytes characterized by presence of eosinophilic granules in the cytoplasm. Correspondence between light microscopy observations and flow cytometry analysis has been confirmed using cell sorting based on relative cell size and complexity parameters. Comparable hemocyte types were also observed in other molluscan species as *Crassostrea ariakensis* (Donaghy *et al.*, 2009), *Crassostrea gigas* (Lambert *et al.*, 2003), *Mytilus edulis* (Le Foll *et al.*, 2010), *Saccostrea glomerata* (Aladaileh *et al.*, 2007).

Blast-like cells were previously named hyalinocytes based on the absence of granules in cytoplasm (Giamberini *et al.*, 1996). However cell type exhibiting same morphological characteristics (high N/C ratio, small size) were described in other molluscan species (Aladaileh *et al.*, 2007; Accorsi *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2005; Travers *et al.*, 2008). This cell type is also characterized by apparent low levels in biological activities (hydrolytic enzymes, oxidative activity, phagocytosis, number of lysosome) as observed in our study (Cima *et al.*, 2000; Donaghy *et al.*, 2009a, 2010). In some works this cell type designation remains variable and was also named lymphoid hemocytes (Xie *et al.*, 2011), basophils (Le Foll *et al.*, 2010), Hemoblast-like (Wang *et al.*, 2012) or small hyalinocytes (Xue *et al.*, 2001). Blast-like cells are considered as hemocytes progenitors according to their morphometric parameters and low organelles content (Cheng 1981; Hine 1999; Rebelo *et al.*, 2013). Moreover, it was indicated that blast-like cells of *Tapes philippinarum* were mitotic hemocytes and were positive for anti-human CD34 antibody which are characteristic of hematopoietic mammalian cells (Cima *et al.*, 2000; Matozzo *et al*., 2008). In our study, flow cytometry analysis of hemocytes functionalities indicated that blast-like cells possessed low oxidative and mitochondrial activities, low lysosomal content and were not phagocytic cells. These results consolidated hypothesis that this cell type is undifferentiated even if process or conditions leading to differentiation into other hemocytes types remain unknown.

Larger agranular cell population was named hyalinocytes as they had a hyaline cytoplasm under light microscopy (Hine 1999). Presence of vacuoles in hyalinocytes has also been reported in further studies (Allam *et al.*, 2002; Aladaileh *et al.*, 2007; Donaghy *et al.*, 2010; Le Foll *et al.*, 2010). *Dreissena polymorpha* granular cells were qualified as eosinophilic granulocytes according to the presence of cytoplasmic granules and their tinctorial affinity. Authors reported presence of eosinophilic granules in other mollusk species such as *Mytilus edulis*, *Perna viridis* or *Perna perna* (Barracco *et al.*, 1999; Le Foll *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012) but also basophilic granules in *Crassostrea ariakensis*, *Haliotis tuberculata* or *Chamelea gallina* (Travers *et al.*, 2008; Donaghy *et al.*, 2009a; Mosca *et al.*, 2011). It was noticed in *Quadrula sp.*, *Tapes philippinarum*, *Cerastoderma edule*, *Ensis silique* and *Mytilus edulis*, other species presence of eosinophilic and basophilic circulating granulocytes while *Crassostrea gigas* and *Saccostrea glomera* exhibited granulocytes containing combination of multiple granule types (Cima *et al.*, 2000; Wootton *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005; Aladaileh *et al.*, 2007; Burkhard *et al.*, 2009). In our study hyalinocytes exhibited hyaline cytoplasm while other authors described basophilic cells named large basophilic hemocytes (Giamberini *et al.*, 1996). Differences were also noticed for granulocyte population whose granules exhibited eosinophilic affinity whereas neutrophilic granulocytes were described elsewhere (Giamberini *et al.*, 1996). In our study, cell fixation was performed with methanol whereas other protocols used glutaraldehyde fixation (Giamberini *et al.*, 1996). Thus, differences observed in cell composition of hemolymph samples can be due to differences in protocols used for cell fixation and staining (Foley & Cheng 1972).

Hemocytes are circulating cells with tissue infiltration capacities. Morphometrical measurements were performed by microscopy and flow cytometry analysis on cells exhibiting different conformational states (adhesive and suspended cells) that may influence results. In our study conditions, cell populations were differentiated upon size criterion for microscopic analysis revealing larger size of hyalinocytes than granulocytes. An identical observation was done with flow cytometry analysis considering mean relative size of cell populations. Moreover for each cell type, FSC and SSC parameters vary among wide range and some overlaps of relative morphological parameters occurred between cell populations. Larger hyalinocyte size compared to granulocytes

has been observed in other mollusk species like *Cerastoderma glaucum* (Matozzo *et al.*, 2007) and *Crassostrea ariakensis* (Donaghy *et al.*, 2009a). The opposite was also observed in *Mytilus galloprovincialis* (Cajaraville 1995), *Ruditapes, philippinarum*, *Mercenaria mercenaria*, *Crassostrea virginica* (Allam et al., 2002a), *Perna viridis* (Donaghy *et al.*, 2011), *Ostrea circumpicta* or *Hyotissa hyotis* (Hong *et al.*, 2013) whereas other studies indicated no difference between hyalinocyte and granulocyte sizes in *Turbo cornutus* (Donaghy *et al.*, 2010), *Quadrula sp*. (Burkhard *et al.*, 2009), *Saccostrea kegaki* (Hong *et al.*, 2013). Le Foll et al. (2010) highlighted quick morphology changes in adherent cells exhibiting condensed and spread phases within few minutes. Changes in morphometrical parameters remain unknown on suspended cells but it was indicated that *Ruditapes decussatus* hyalinocytes were smaller than granulocytes after cytocentrifugation while an opposite observation was done when cell were fixed in suspension (López *et al.*, 1997). On the other hand, cytocentrifuged cells were fixed with methanol while formaldehyde was used for cell suspension fixation. Differences in fixation protocol used in this study may indicate that this factor may influence cell size parameters (López *et al.*, 1997). In addition, some studies based on flow cytometry analysis discriminated cell types into different groups of size (Hégaret et al., 2003; Allam et al., 2002a; García-García *et al.*, 2008). Such observations may be due to cell size plasticity. Differentiation of hemocyte subtypes based on cell size is not a sufficient parameter given to cell plasticity observed in microscopy and flow cytometry. Studies highlighted wide inter and intra-species variabilities of hemocytes populations that might be amplified by measurement methodologies. Use of morphological and staining features allows identification of cells exhibiting different characteristics but it is essential to keep in mind protocol limitations to avoid result misinterpretations.

Our results indicated that the cell types with the highest phagocytic activities also had the highest intracellular ROS production. Oxidative activity was detected during the two sampling period mainly in hyalinocytes and granulocytes of *Dreissena polymorpha* while it remained low in blast-like cells. Low level of oxidative activity in blast-like cells was also observed in other mollusk species *Crassostrea gigas* (Delaporte *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2007b; Hurtado *et al.*, 2011), *Crassostrea virginica* (Hégaret *et al.*, 2003),

Ruditapes decussatus (Prado-Alvarez *et al.*, 2012) whereas granulocytes exhibited the highest activity.

In our study, both granulocytes and hyalinocytes were able to perform phagocytosis with higher level for hyalinocytes. Other studies indicated that both granulocytes and hyalinocytes were performing phagocytosis with higher activity for granulocytes in *Mytilus galloprovincialis* (Cajaraville 1995), *Crassostrea ariakensis* (Donaghy *et al.*, 2009a), *Cerastoderma glaucum* (Matozzo *et al.*, 2007), *Perna viridis* (Donaghy et al., 2011; Wang *et al.*, 2012), *Mercenaria mercenaria* (Tripp 1992), *Saccostrea glomerata* (Aladaileh *et al.*, 2007), *Ruditapes decussatus* (López *et al.*, 1997). Moreover, some authors highlighted that only granulocytes possessed this capacity (Nakayama *et al.*, 1997; Wikfors & Alix 2014) while no granular cells are found in some scallops species (Hine 1999; Estrada *et al.*, 2013) resulting in a phagocytic activity relying on agranular cells as single effector (Mortensen & Glette 1996; Donaghy *et al.*, 2010). Such variations might be linked to multiple factors as differences in measurement methods or in particles used to perform the assay (carboxylate or polystyrene latex beads with different sizes ; FITC-labelled bacteria or yeasts…). It was highlighted that granulocyte phagocytic activity was higher when latex beads were used compared to zymosan particles or *E. coli* bacteria (Prado-Alvarez *et al.*, 2012). Phagocytic activity of granulocytes from *Crassostrea gigas* were more efficient to engulfed different bacteria strains while hyalinocytes were more active for erythrocytes and latex beads (Takahashi & Mori 2000). Such differences were also observed in the same species with zymosan and latex beads as foreign particles (Terahara *et al.*, 2006). Moreover in the oyster species *Tiostrea chilensis* infected by *Bonamia sp*., most pathogens were phagocytosed by agranular cells (Hine & Wesney 1994). According to these comments, we cannot exclude that *Dreissena polymorpha* granulocytes may have highest phagocytic activity than hyalinocytes in presence of other types of particles. These results are consistent with hypothesis already proposed by Hine (1999) which stated that phagocytic ability may be more related to phagocytosed particle nature rather than differences in hemocyte ability.

Giamberini et al. (1996) detected presence of acid phosphatase and non-specific esterase in both hyalinocytes and granulocytes while β-glucuronidase was detected only in hyalinocytes. *Crassostrea gigas* hyalinocytes produced more reactive nitrogen species (RNS) than granulocytes. This RNS production can also oxidize DCFH into fluorescent DCF (Lambert *et al.*, 2007b; Kalyanaraman *et al.*, 2012). These observations led us to hypothesize that mechanisms for killing foreign particles might be different between hyalinocytes and granulocytes (Wikfors & Alix 2014). Different degradation pathways could then be linked to different cell phagocytic abilities depending on particle nature to optimize degradation efficiency. Further investigations are needed to confirm these hypotheses. Cheng suggested that different hemocyte types perform distinct functions (Cheng 1984). This cannot be fully confirmed according to our results indicating that hyalinocytes and granulocytes were fully equipped for innate immune response and exhibited similar functionalities. However, we cannot exclude that functional differences between hemocyte types might be greater considering their implications in other physiological processes (nutrition, shell and tissues repair…).

Hypothesis of one cell lineage maturation from blast-like hemocytes to hyalinocytes, then granulocytes cannot be fully demonstrated according to our results (Cheng 1981; Rebelo *et al.*, 2013). Blast-like hemocytes might be considered as cell precursor in relation to their morpho-functional parameters. Moreover, flow cytometric distribution of cells in size *versus* complexity highlight a continuum between the different cell populations (hyalinocytes and granulocytes) suggesting maturation process. On the other hand, in our experimental conditions, hyalinocytes represented the main and most phagocytic active cell type. Such observation was not consistent with hypothesis of cell maturation to the granulocyte type. For a better understanding of these processes, other studies on hemocyte functionalities considering their different physiological implications are needed with a concomitant development of molecular tools.

Cellular activities assessed in our study were different between the two studied periods (gametogenesis or spawning period). The spawning period was associated to relative low levels of hemocyte activities resulting in apparent physiological modulation. Hemocyte concentration and viability remained unchanged while differential cell counts

were modified. Annual variations in granulocytes and agranular hemocytes distributions in *Mytilus galloprovincialis, Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* hemolymph were also observed elsewhere (Carballal *et al.*, 1998; Takahashi & Mori 2000; Hong *et al.*, 2014). In these studies, authors highlighted an increase in hyalinocyte proportion during reproductive period in *M. galloprovincialis* and *R. philippinarum* while opposite results were observed in *C. gigas*. However, it was not possible to determine if these differences were due to an increase in tissue infiltrating granulocytes or were related to hemopoietic process. Spawning period is characterized by decrease in energetic reserves (Delaporte *et al.*, 2006; Semain *et al.*, 2007). It was observed in *Dreissena polymorpha* with glycogenic and lipid reserve depletions during spawning which may explain the decrease in hemocyte mitochondrial activity observed in our study (Palais *et al.*, 2011). The concomitant decrease in hemocyte ROS production and mitochondrial activity observed during spawning period was in accordance with the main mitochondrial origin of hemocyte oxidative metabolism (Donaghy *et al.*, 2012b). Moreover, during an annual monitoring of *Crassostrea gigas* immune parameters, Delaporte *et al*. highlighted a greater decrease in hemocytes oxidative activity during spawning of mollusks with the highest reproductive implication (Delaporte *et al.*, 2007). Immunomodulation was also reported during spawning period in *Crassostrea. gigas*, *Mytilus edulis, Mytilus trossulus, Ruditapes philippinarum* and *Haliotis tuberculata* resulting in a lower phagocytic activity (Cartier *et al.*, 2004; Duchemin et al., 2007; Travers *et al.*, 2008; Ciacci et al., 2009; Hong *et al.*, 2014). Moreover, numerous hemocytes were located in gonadal tissues of *Mytilus galloprovincialis* during spawning events in relation with possible implication in absorption of products deriving from gametes atresia (Suárez *et al.*, 2005). Similar observations were done in *Dreissena polymorpha* histological gonadal sections (Borcherding 1991). Hemocyte mobilization in physiological functions such as reproduction may explain the increase in lysosomal content and the lower hemocytes ability to phagocytize additional particles during this period. In addition, other works indicated gender-related differences of some immune parameters depending on species considered (Matozzo & Marin 2010; Dang *et al.*, 2012). Further investigations are needed to know how hemocyte functionalities of *Dreissena polymorpha* are influenced by this physiological parameter.

Changes in hemocyte proportions associated with low immune and metabolic parameters observed during spawning period could potentially increase mussel susceptibility to some environmental stress (Travers *et al.*, 2008; Samain *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Matozzo *et al.*, 2012). Reproductive and metabolic status must be taken into account for eco-immunological studies on *Dreissena polymorpha* according to the impact on hemocyte physiological functionalities. In a general way, considering granulocytes as main phagocytic effectors need to be qualified according to diversity of hemocytes responses observed in literature which may be due to experimental condition heterogeneities.

Acknowledgements

This work was supported by the Champagne-Ardenne Region (France), by the Canadian Chair in Environmental Immunotoxicology, by the CFQCU (Conseil Franco-Québécois de Coopération Universitaire) and by a grant from both ANR and NSERC Agencies (joined France-Canada project) as a part of the research programme IPOC (Interactions between POllution and Climate changes: Development of improved monitoring strategy, ANR-12-ISV7-0004-01, 2013-2015).

The authors thank Dr. Damien Rioult and the technical platform of environmental cytometry MOBICYTE (University of Reims/INERIS) for its technical support.

Chapitre 4: Approches expérimentales en laboratoire

Les études en laboratoire constituent la principale approche utilisée en évaluation du risque écotoxicologique. Lors de ces expérimentations, les organismes sont généralement exposés à des concentrations croissantes à un composé seul. Dans ce type d'expérimentations, afin d'optimiser les performances des groupes témoins, les individus tests sont placés dans leurs conditions optimales ou similaires aux conditions environnementales lorsque les espèces sont prélevées dans l'environnement. Dans le milieu naturel, les organismes doivent faire face à de nombreux stress complémentaires pouvant potentiellement moduler les effets des contaminants chimiques comparativement aux conditions optimales. De ce fait, il est important de déterminer dans quelles proportions les facteurs naturels vont influencer les réponses biologiques mesurées mais également comment vont-ils interagir avec les effets toxiques des contaminants. La complexité d'interprétation des données d'interactions entre plusieurs facteurs de stress *in situ* est difficile du fait de l'absence totale de contrôle des paramètres expérimentaux. L'utilisation d'expérimentations en laboratoire permet un meilleur contrôle de nombreux paramètres ce qui permet une meilleure reproductibilité et facilite l'interprétation des résultats.

Ce chapitre de thèse se compose de deux parties qui regroupent les expérimentations en milieu contrôlé mises en place durant ces travaux. La première partie concerne l'évaluation de la toxicité du cadmium au travers d'expositions *ex vivo* des cellules hémocytaires. L'analyse des effets sur les différents marqueurs fonctionnels développés a été réalisée à l'échelle de chaque sous-populations hémocytaires afin d'estimer leur niveau de sensibilité au stress chimique. Dans ce contexte, le stress chimique est représenté par un xénobiotique modèle : le cadmium. Cette partie est présentée sous forme d'un article soumis dans le journal « **Ecotoxicology and Environmental Safety** ». La seconde partie regroupe les expérimentations *in vivo* visant à évaluer si des changements de paramètres physico-chimiques de l'eau (température et pH) entrainent des modulations des paramètres structuraux et fonctionnels des hémocytes. Une approche « stress on stress » a également été mise en place en couplant les approches *in vivo* et *ex vivo* afin de déterminer si les modifications des facteurs températures ou de pH vont entrainer des modulations des effets toxiques du cadmium sur les hémocytes.

Partie 1 : Approche *ex vivo* : effets du cadmium sur les paramètres fonctionnels hémocytaires chez la dreissène

L'absence de lignées hémocytaire pérenne chez les bivalves permettant le renouvellement des cellules en culture sur de longues durées implique d'utiliser des cellules fraichement prélevées de l'animal sur une plus courte période. L'utilisation de cellules isolées en dehors de l'organisme crée un système simplifié qui va permettre le contrôle de nombreux paramètres expérimentaux. Cette méthodologie a été utilisée chez les mollusques dans des contextes variés comme l'étude du système nerveux, de l'homéostasie des organes, en immunobiologie ou encore en toxicologie (Yoshiro *et al.*, 2013 ; Ladhar-Chaabouni *et al.*, 2015).

Dans le cadre d'une étude immunotoxicologique, l'utilisation d'expositions *ex vivo* vise à analyser les mécanismes mis en jeux lors de l'interaction entre les xénobiotiques et les cellules. Cette démarche permet de déterminer rapidement si une molécule induit des effets délétères sur les fonctionnalités hémocytaires et par extension perturbe l'homéostasie de l'individu. Parmi les processus physiologiques pouvant être perturbés par les contaminants, il a été démontré que la composante hémocytaire liée à la phagocytose était un des systèmes les plus sensibles (Fournier *et al.*, 2000). Cette démarche a été fréquemment utilisée chez les mollusques pour comprendre les effets de polluants variés comme les métaux, les PCB, les HAP, les pesticides, les résidus pharmaceutiques, les nanoparticules… sur les cellules effectrices de l'immunité (Brousseau *et al.*, 2000, Sauvé *et al.*, 2002, Canesi *et al.*, 2003, Gagnaire *et al.*, 2006, Bado-Nilles *et al.*, 2008, Bruneau *et al.*, 2013, Moreau *et al.*, 2014, Lacaze *et al.*, 2015).

Parmi les contaminants retrouvés dans l'environnement, les éléments traces métalliques constituent une classe de contaminants très étudiée chez les mollusques. Au sein de la catégorie des ETMs, le cadmium constitue un des éléments les plus toxiques et ses effets sur les bivalves sont largement documentés dans la littérature. Bien que ce métal soit rejeté par les activités naturelles comme les éruptions volcaniques, la principale source d'émission provient de l'industrie. C'est un sous-produit de raffinage du plomb,

zinc et cuivre qui est utilisé dans la fabrication d'accumulateurs électriques, l'industrie électronique et chimique (INERIS 2014).

Chez les bivalves, les cellules hémocytaires sont connues pour jouer un rôle actif dans le métabolisme des métaux (Giamberini *et al.*, 1996, Fisher 2004). Il a été montré qu'une exposition *in vivo* au cadmium induit une augmentation de la concentration hémocytaire chez *Crassostrea virginica, Mytilus edulis* et *Ostrea edulis* (Cheng 1988 ; Coles *et al.,* 1995 ; Auffret *et al.*, 2002). Les fonctionnalités des hémocytes sont également affectées par ce contaminant, notamment au niveau du métabolisme oxydatif des cellules, il a été montré chez *Crassostrea gigas* une activation de la production de ROS à de faibles concentrations et une inhibition à plus fortes concentrations (Anderson *et al*., 1992 ; Roesijadi *et al.*, 1997 ; Auffret *et al.*, 2002 ; Koutsogiannaki *et al*., 2006 ; Dailianis *et al*., 2009). Chez *Ostrea edulis*, la production de ROS a été inhibée par le cadmium de façon concomitante au potentiel transmembranaire mitochondrial (Auffret *et al.*, 2002). L'exposition au cadmium induit également une déstabilisation des membranes lysosomales (Coles *et al.*, 1995 ; Matozzo *et al.*, 2001). Le mécanisme de phagocytose est également affecté chez de nombreuses espèces de bivalves marin et d'eaux douces (Sauvé *et al.*, 2002). Chez *Mya arenaria* il a été observé un effet hormétique stimulant les capacités de phagocytose à faible concentration et inhibant ce mécanisme à plus forte concentration (Brousseau *et al.*, 2000). Chez *Crassostrea virginica*, une exposition au cadmium induit une augmentation de l'expression des gènes des métallothionéines comme système de détoxication du polluant (Butler *et al.*, 2000 ; Butler & Roesijadi 2001). Le contaminant affecte également les réponses humorales en diminuant leur synthèse ou activité chez *C. virginica* et *M. edulis* (Cheng 1990 ; Coles *et al.*, 1995). Le cadmium induit également l'apoptose des cellules hémocytaires mais peut également induire la mort cellulaire par nécrose (Brousseau *et al.*, 2000 ; Olabarrieta *et al.*, 2001 ; Sokolova *et al.*, 2004 ; Caza *et al.*, 2015).

La toxicité du cadmium sur les cellules hémocytaires étant bien documentée, nous avons choisi d'utiliser ce contaminant comme référence afin de comparer la sensibilité des marqueurs fonctionnels mis au point sur les différentes composantes hémocytaires. L'analyse étant réalisée à l'échelle de la sous-population cellulaire, ces travaux vont

permettre de déterminer s'il existe des différences de sensibilité au contaminant entre les différents types hémocytaires.

Notre étude intitulée « Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *Dreissena polymorpha* » a été soumise pour publication au journal « **Ecotoxicology and Environmental Safety** ».

L'objectif de cette étude est de déterminer, au travers de la mesure de plusieurs marqueurs, si les fonctionnalités hémocytaires peuvent être différemment affectées selon la sous-population hémocytaire considérée. Pour ce faire, les hémocytes ont été exposés *ex vivo* à des concentrations en cadmium comprises entre 10^{-6} M et 10^{-3} M, pendant 21 heures avant analyse en cytométrie de flux. Les marqueurs testés (viabilité, phagocytose, activité oxydative, contenu en lysosomes) sont affectés de façon dose dépendante avec des différences de sensibilité entre les marqueurs ciblés et selon la population hémocytaire considérée. L'analyse des effets du cadmium sur la viabilité hémocytaire indique que ce marqueur est faiblement affecté par les concentrations en cadmium testées. Avec une CE_{50} calculée de $4.70 \pm 1.01 \times 10^{-3}$ M, il constitue le marqueur le moins sensible parmi ceux testés lors de l'étude.

Si l'on considère les effets du cadmium sur le contenu en lysosomes des hémocytes, les résultats indiquent une valeur de CE_{50} significativement supérieure dans les granulocytes comparativement aux hyalinocytes (CE_{50} granulo. = $3.59 \pm 0.67 \times 10^{-3}$ M ; CE_{50} hyalino. = $2.09 \pm 0.57 \times 10^{-3}$ M).

L'activité mitochondriale a été affectée uniquement dans les hémocytes de type blaste, considérés comme étant des hémocytes précurseurs.

Nos résultats indiquent que les marqueurs associés au mécanisme de phagocytose constituent les mécanismes les plus sensibles au cadmium, ce qui se traduit par une valeur de CE_{50} significativement plus faible comparée aux autres marqueurs étudiés.

Article 2: Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *Dreissena polymorpha*

Evariste Lauris [a,c], Rioult Damien [b], Brousseau Pauline [c], Geffard Alain [a], David Elise [a], Auffret Michel [d], Fournier Michel [c], Betoulle Stéphane [a]

[a] Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-INERIS 02 SEBIO (Stress environnementaux et biosurveillance des milieux aquatiques), Reims, France

[b] Université de Reims Champagne-Ardenne/Institut national de l'environnement industriel et des risques, Plateau technique de cytométrie environnementale MOBICYTE, Reims, France

[c] INRS, Institut Armand Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada

[d] Institut Universitaire Européen de la Mer, Laboratoire LEMAR, Plouzané, France

Abstract

Increasing discharge of industrial wastes into the environment results in pollution transfer towards hydrosystems. These activities release heavy metals such as cadmium, known as persistent pollutant that is accumulated by molluscs. Among molluscs, the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* is a widely distributed invasive freshwater bivalve. According to its biological traits, this species constitutes a suitable support for ecotoxicological studies and was recently proposed as the freshwater counterpart of the blue mussel *Mytilus edulis* for pollution monitoring. In molluscs, homeostasis maintain is ensured in part by hemocytes that are composed of several populations involved in multiple physiological processes such as cell-mediated immune response or metal metabolism. Thus, hemocytes constitute a target of concern to study adverse effects of heavy metals.

The objective of this study was to assess multiple endpoints to determine how hemocyte functionalities may be differentially affected depending on hemocyte subpopulation considered. Hemocytes were exposed *ex vivo* to concentrations of cadmium ranging from 10^{-6} M to 10^{-3} M for 21 hours prior flow cytometric analysis of cellular markers.

Measured parameters (viability, phagocytosis, oxidative activity, lysosomal content) were affected in a dose-dependent manner with sensitivity differences depending on endpoint and cell type considered. Lysosomal content of granulocytes was differentially affected and indicated lower sensitivity to cadmium suggesting that this cell type is greatly involved in metal metabolism. Mitochondrial activity was affected only in blast-like hemocytes that are considered to be cell precursors. Impairment of these cell functionalities may potentially compromise functions ensured by differentiated cells. Our results indicated that phagocytosis related endpoints were the most sensitive mechanisms to cadmium.

Keywords: *Dreissena polymorpha*, hemocytes, cadmium, metal, phagocytosis

I. Introduction

The zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, is an invasive freshwater bivalve mollusc distributed in Western Europe and North America. Because of its biological characteristics (abundance, wide geographical distribution, sessile life and high filtration activity), transplanted or natural populations of zebra mussels were used as sentinel species for freshwater pollution monitoring in field or laboratory conditions (de Lafontaine *et al*. 2000; Minier *et al.*, 2006; Binelli *et al.*, 2009; Bourgeault et al., 2010; Palais *et al.,* 2010; Parolini *et al.*, 2010; Faria *et al.*, 2011). This species was recently proposed to represent the freshwater counterpart of the blue mussel, *Mytilus edulis*, for ecotoxicological studies (Binelli *et al.*, 2015).

The ecotoxicological risk assessment can be based on analysis of early physio-pathological responses at the sub-individual level and signing the health status of organisms before any observable effects in related populations. Among usable responses evaluated in mussel models, those related to hemocytes are of great interest. Allowing multi-parametric analysis by flow cytometry with non-lethal sampling procedure, hemocytes may constitute an interesting support in ecotoxicological risk assessment (Brousseau *et al.*, 1998; Auffret *et al.*, 2005).

In molluscs, cellular activities related to immunity are performed by hemocytes and rely on phagocytosis and encapsulation process. Phagocytosis consists in endocytosis of

foreigner particles in phagolysosomes where degradation takes place through action of lysosomal enzymes, reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide production (Canesi *et al.*, 2002; Ottaviani 2011; Allam *et al.*, 2015; Soudant *et al.*, 2013). Bivalve molluscs have an open circulating system in which hemocytes may be in direct contact with environmental stressors as chemical contaminants. Consequently, *in vitro* exposures of hemocytes were performed to simulate xenobiotics interactions with cells and then assess their immunotoxic potential (Renault, 2015). Among the numerous cellular activities measured by flow cytometry, it is interesting to estimate sensitivity level of each of them in response to a chemical stress.

Cadmium is a non-essential metal and persistent pollutant in the environment known to exercise toxicity on human and wildlife. Several studies demonstrated that cadmium immunotoxic effects were related to disturbances in hemocyte functionalities such as phagocytosis, oxidative metabolism, lysosomal activity and induced apoptosis (Brousseau *et al.*, 2000; Olabarrieta *et al.*, 2001; Sokolova *et al.*, 2004; Dailianis 2009; Latire *et al.*, 2012; Caza *et al.*, 2015). In *Dreissena polymorpha*, Sauvé *et al.*, 2002 demonstrated that hemocyte phagocytosis was reduced in a dose dependent manner in response to an *ex vivo* cadmium exposure. Immunological responses are mechanisms of concern according to its central importance to maintain organism integrity. Moreover, this physiological process is sensitive to contaminants and its alteration may lead to increase susceptibility to pathogens (Pipe & Coles 1995; Fournier *et al.*, 2000).

Immunotoxicological studies are performed considering hemocytes as a single cell type while numerous mollusc species possess several hemocyte subpopulations expressing different functional capacities suggesting different implications in physiological processes (Cheng 1984; Auffret 1988; Hine 1999; Donaghy *et al.*, 2009b; Le Foll *et al.*, 2010). In zebra mussel hemolymph, three hemocyte types were described as hyalinocytes and blast-like hemocyte for agranular cells and one granulocyte population that may possess different functional capacities (Giamberini *et al.*, 1996). In the present study, we compared sensitivity of cellular activities in hemocytes exposed to cadmium in a dose-dependent manner. Functional responses were evaluated at cellular sub-population level using a multi-biomarker approach analyzed by flow cytometry. The aim

of the study is to analyze how cell functionalities may be differentially affected by cadmium in relation to the hemocyte subtype. Results may lead to a better knowledge of sensitivity levels of the different hemocyte functional markers in an ecotoxicological risk assessment context.

II. Materials and Methods

II.1. Animals and hemolymph collection

Zebra mussels were collected by divers at Lac du Der (Marne, France) in September 2015, The mussels were sampled outside their breeding period, minimizing confounding effects related to biotic and abiotic stresses on the different biological responses measured. Prior to experiment, mussels were maintained 2 weeks at laboratory in aerated tanks filled with natural spring water and fed with lyophilized *Chlorella vulgaris* (10^6 cells day^{-1} $mussel^{-1}$). Mussels were maintained at 12°C in accordance with field water temperatures. Large individuals (N=14; 28.57 ±2 mm; 1.76 ±0.46 g) were selected in order to ensure withdrawn of sufficient hemocyte amount to perform assay at individual scale. Hemolymph was withdrawn from adductor muscle using 0.5 mL insulin syringes fitted with 29G needles.

II.2. *Ex vivo* exposure of hemocytes to cadmium

After sampling, hemocyte concentration was determined using BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). Cells were then transferred in sterile tubes at $2x10^5$ cell/mL, diluted with Leibovitz's L-15 medium modified for zebra mussels according to Quin *et al.*, 2009 with some modifications (L-15 medium (15% v/v), distilled water (85% v/v), HEPES 10 mM, L-Glutamine 2 mM, Penicillin 100 IU/mL, Streptomycin 100 µg/mL, pH 7.5, 0.2 µm filtered).

For exposure, stock and working solution of cadmium chloride hemi-(pentahydrate) (Sigma-Aldrich®) were prepared in hemocyte culture media. Cadmium working solutions was added to cell suspension to reach final cadmium concentration of 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4},

$5x10^{-4}$ and 10^{-3} M. Controls were performed by adding cadmium-free culture medium to cell suspension.

II.3. Hemocyte viability and phagocytosis

Hemocytes were incubated with cadmium at 16°C for 21 hours. This exposure duration corresponds to the time required to experimentally obtain optimal phagocytosis activity in the test described below (Brousseau *et al.*, 1998; Sauvé *et al.*, 2002). For analysis, cell subtypes were separated according to their autofluorescence light scattering parameters (FSC-H versus SSC-H dotplots) (Figure 4.1).

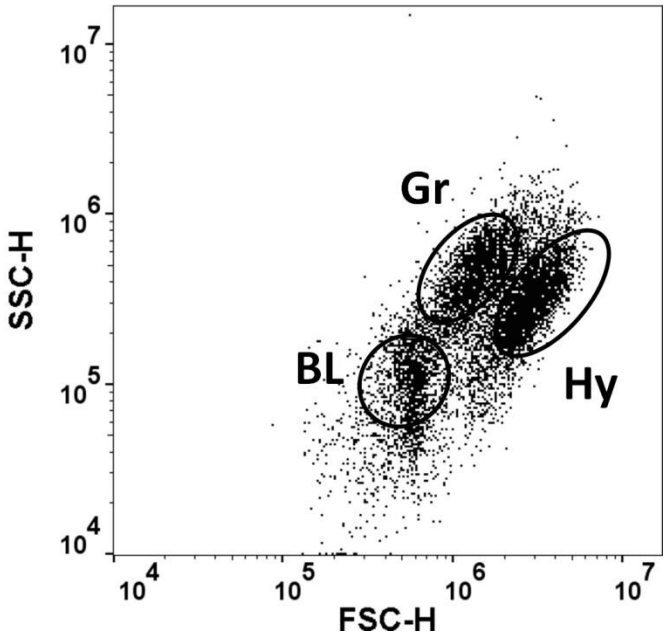


Figure 4. 1 : Dotplot presenting hemocyte populations according to their relative size (FSC-H) and complexity (SSC-H). Hy: Hyalinocytes, Gr: Granulocytes, BL: Blast-like hemocytes.

After 21 hours incubation with cadmium, cell viability was evaluated using propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich) at 10 $\mu g.mL^{-1}$ final concentration and analyzed by flow cytometry using 488 nm excitation laser and measuring fluorescence in associated

channel through 585/15 nm filter. Dead cells with injured membrane are positive to the red fluorescence-emitting probe bound to DNA. Results are expressed as viability percentage (100% – percentage of PI-positive cells).

The phagocytic activity was measured using 2µm diameter yellow-green fluorescent latex microspheres (Brousseau *et al.*, 1998) (Fluoresbrite®, PolyScience). Latex beads were added to hemocyte suspension 3 hours after the beginning of cell incubation with cadmium. Cells were then incubated with beads and xenobiotic for 18 hours in dark at 16°C with a 1:100 hemocyte-beads ratio. Flow cytometric analysis was performed by measuring fluorescence emitted by cells in FL-1 channel (530 nm) associated to 488 nm excitation laser. Percentage of phagocytic hemocytes corresponds to cells that engulfed at least three fluorescent beads and the mean number of engulfed beads per phagocytic cell was calculated as follow: mean fluorescence related to three beads and more divided by mean fluorescence of one bead.

II.4. Basal oxidative activity

Basal reactive oxygen species (ROS) production by hemocytes was measured using 2′,7′-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA; Sigma-Aldrich) as probe. The nonfluorescent probe freely diffuses into cells where it is de-esterified by intracellular esterase and oxidized by ROS leading to green-fluorescent molecule (DCF). Hemocytes were incubated with DCFH-DA for 120 min at 16°C in dark before processing flow cytometry analysis. Relative intracellular oxidative activity corresponds to mean fluorescence intensity (MFI; EX. 488 nm, EM. 525/15 nm) in arbitrary units (A.U.).

II.5. Lysosomal content

Relative amount of lysosomes in hemocytes was measured using Lysotracker Red DND-99 (Invitrogen, Life technologies), a fluorescent dye that accumulate specifically in acidic organelles. Cells were incubated in the dark with probe at 1 µM final concentration

for 15 min at 16°C. Lysosomal amount corresponds to mean fluorescence intensity (MFI; EX. 488 nm, EM. 585/15 nm) in arbitrary units (A.U.).

II.6. Mitochondrial activity

Hemocyte mitochondrial activity was evaluated using Mitotracker Red CMXRos (Invitrogen, Life technologies) a specific fluorescent probe which integrates mitochondria according to its membrane potential. Cells were incubated at 16°C in the dark for 15 min with 50 nM final concentration of Mitotracker probe. Relative mitochondrial activity corresponds to mean fluorescence intensity (MFI; EX. 488 nm, EM. 585/15 nm) in arbitrary units (A.U.).

II.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using STATISTICA 8.0 software. Data were tested for normality with Kolmogorov-Smirnov test and homogeneity of variances with Levene test. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Tukey test were used to compare treatment effects. Data that did not meet assumption of normality and homoscedasticity were analyzed whit non-parametric Kruskal-Wallis (K-W) test followed by multiple comparisons of mean ranks. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Results are expressed as percentage of control that was arbitrary set to 100%. Data are presented as mean ± Standard Error of Mean (S.E.M.). Non-linear regressions (Hill model) using the Excel™ macro REGTOX v7.0.6 were conducted on raw data to calculate the effective concentration that induced 50% reduction of hemocyte endpoints measured (EC_{50}) (Vindimian 2012). Mean EC_{50} of functional endpoints were compared between them using ANOVA followed by post-hoc Tukey test.

III. Results

III.1. Effects of cadmium on hemocyte viability

In this study, zebra mussel hemocytes were exposed during 21 hours to concentrations ranging from 10^{-6} to 10^{-3} M of cadmium. Results indicated a significant negative effect of cadmium on hemocyte viability through a significant increase of PI positive cells at the higher concentration assessed (10^{-3} M) while other concentrations were not significantly different from control (Figure 4.2). Calculated cadmium concentration that reduces hemocyte viability to 50% (EC_{50}) was 4.70 ± 1.01 x10^{-3} M (Table 4.1).

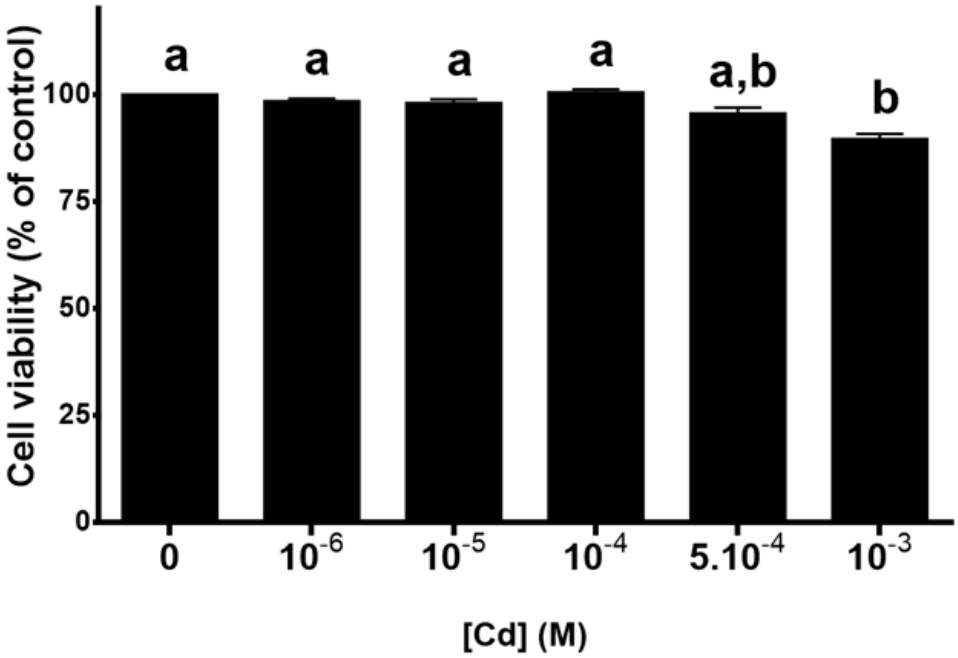


Figure 4. 2 : Effects of cadmium on hemocyte viability. Results are expressed as percentage of control ± S.E.M. Letters indicate significant differences between concentrations tested (ANOVA $p < 0.05$ followed by Tukey test).

III.2. Effects of cadmium on phagocytosis parameters

The effect of cadmium was evaluated on parameters related to hemocyte phagocytic activity. Blast-like hemocytes were non-phagocytic cells. Dose-dependent decreases in phagocytic cells and also in mean number of beads per hemocyte were reported for hyalinocytes and granulocytes (Figure 3A, 3B). Percentage of hemocytes that engulfed at least 3 beads was reduced by 60% for hyalinocytes and 50% for granulocytes at $5x10^{-4}$ M of Cd (Figure 3B). Calculated EC_{50} for phagocytic activities were 3.83 ± 0.53 $x10^{-4}$ M for hyalinocytes and 6.14 ± 1.19 $x10^{-4}$ M for granulocytes. Considering the mean number of ingested beads, calculated EC_{50} were 2.64 ± 0.48 $x10^{-4}$ M for hyalinocytes and 3.64 ± 0.95 $x10^{-4}$ M for granulocytes (Table 4.1).

III.3. Effects of cadmium on basal oxidative activity

Intracellular ROS level observed in granulocytes was not significantly affected by cadmium exposure (ANOVA; p = 0.102). In contrast, significant differences were detected in ROS level of agranular hemocytes (hyalinocytes: p = 0.016; Blast-like: p = 0.009) (Figure 4.4 A). For hyalinocytes, differences were noticed only between 10^{-4} and 10^{-3} M. These concentrations corresponded respectively to the maximal (135%) and minimal (80%) percentage of ROS production in comparison with control. In blast-like hemocytes, the highest cadmium concentration assessed significantly reduced hemocyte oxidative activity compared to concentrations ranging from 10^{-6} to 10^{-4} M of cadmium (ANOVA, p = 0.009). EC_{50} values were 9.37 ± 0.88 $x10^{-4}$ M for hyalinocytes, 7.69 ± 1.25 $x10^{-4}$ M for granulocytes and 8.45 ± 1.32 $x10^{-4}$ M for blast-like hemocytes and were not significantly different between them (Table 4.1).

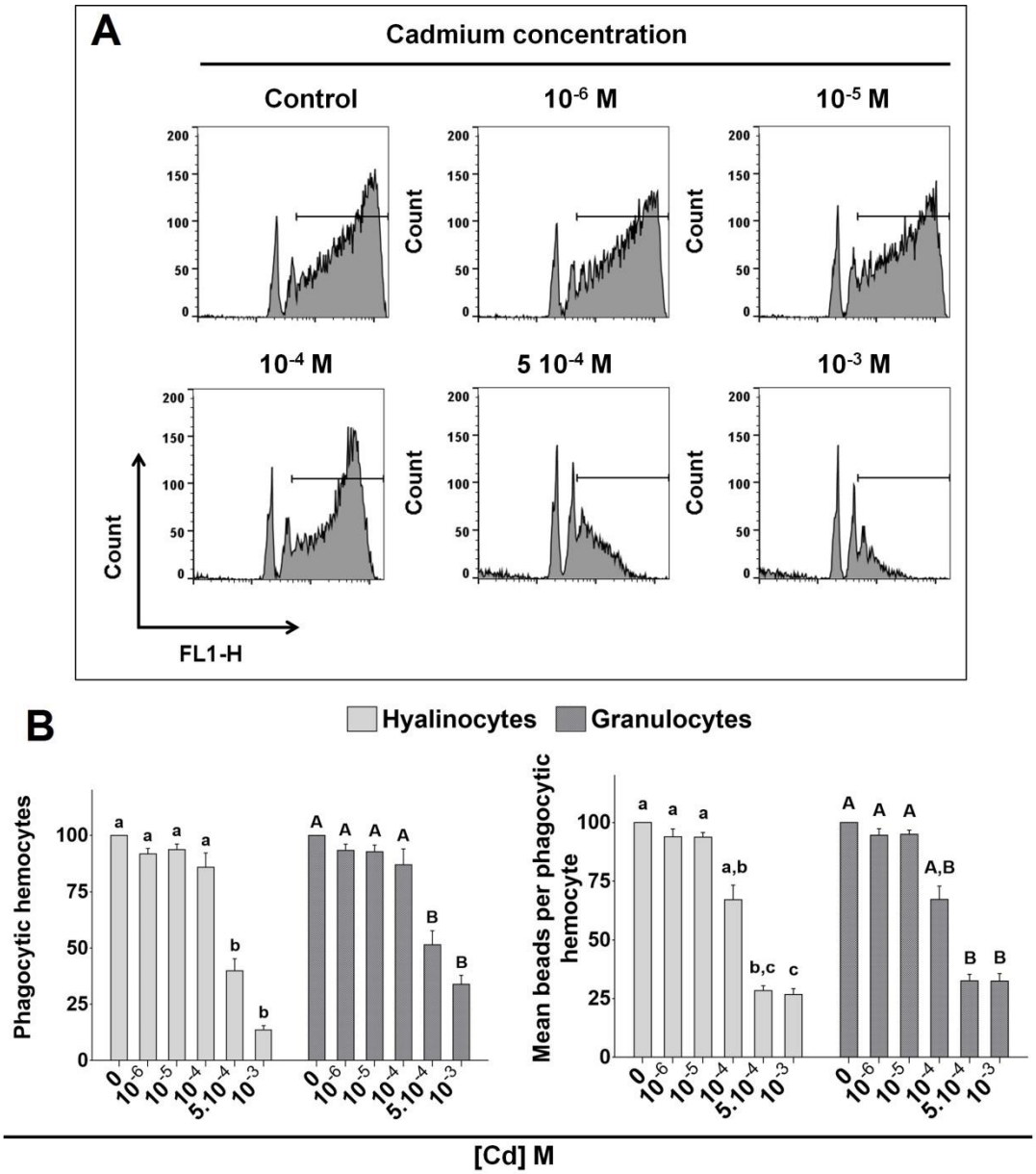


Figure 4. 3 : Effects of cadmium on phagocytic activity measurement. A: Effects of cadmium concentrations on phagocytic hemocytes. Phagocytic hemocytes correspond to cells that engulfed at least three beads (marker). B: Phagocytic activity of hemocytes and mean number of ingested beads for hyalinocytes and granulocytes populations. Results are expressed as mean percentage of control ± S.E.M. Letters indicate significant differences between concentrations tested (ANOVA p <0.05 followed by Tukey test for phagocytic hemocytes; Kruskal-Wallis p <0.05 followed by multiple comparisons of mean ranks for mean ingested beads per hemocyte).

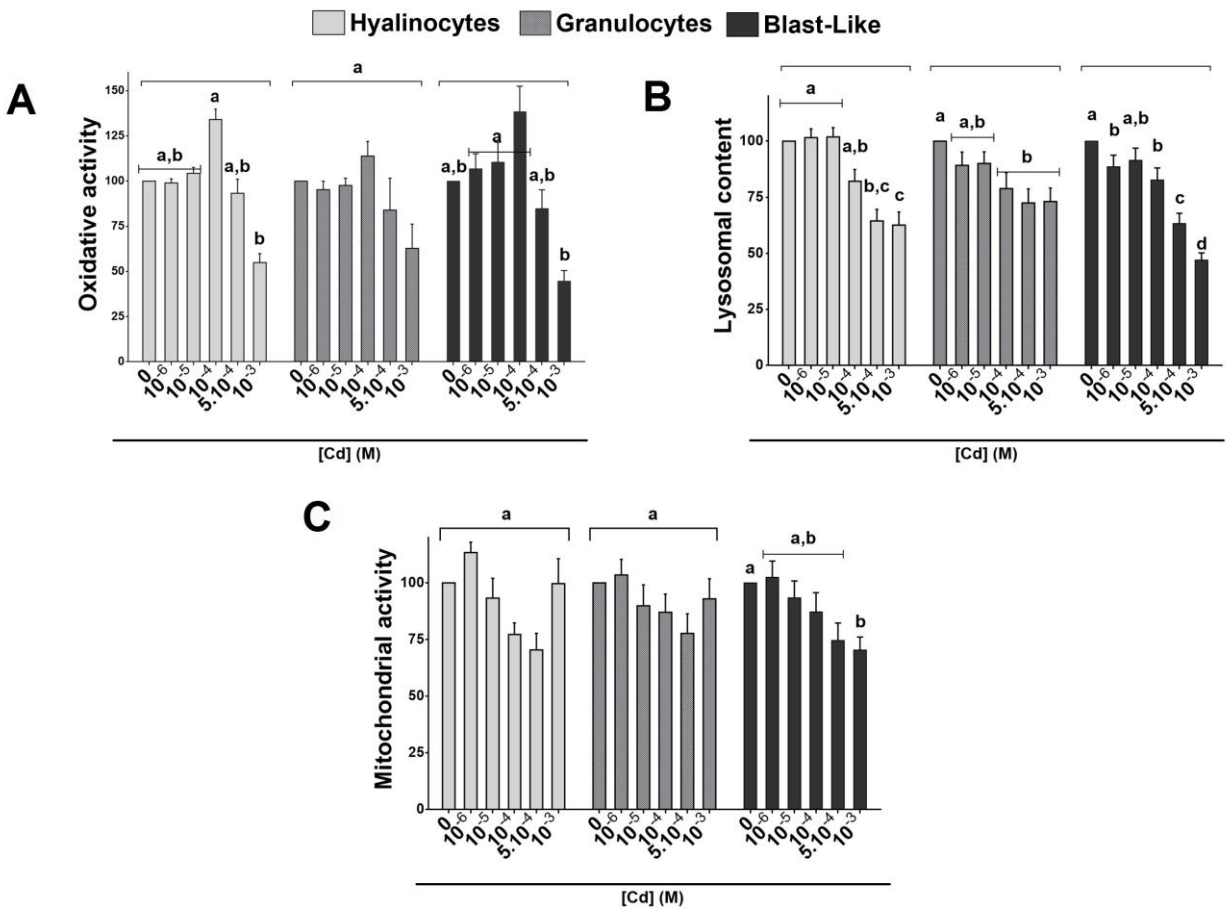


Figure 4. 4 : Effects of cadmium on functional parameters of hemocytes after 21 hours of exposure. (A) Hemocyte oxidative activity, (B) Lysosomal content, (C) Mitochondrial activity. Results are expressed as mean percentage of control ± S.E.M. Letters indicate significant differences between concentrations tested for each cell population (ANOVA $p < 0.05$ followed by Tukey test).

III.4. Effects of cadmium on hemocyte lysosomal content

After 21 hours of exposure to cadmium, lysosomal content of the three hemocyte types was affected in a concentration-dependent manner (Figure 4.4 B). The low observed effect concentration (LOEC) was 5 x10^{-4} M for hyalinocytes, 10^{-4} M for granulocytes and 10^{-6} M of cadmium for blast-like hemocytes. Calculated EC_{50} for granulocytes was 3.59

± 0.67 x10^{-3} M that is significantly different from value of 2.09 ± 0.57 x10^{-3} M and 1.12 ± 0.22 10^{-3} M obtained for hyalinocytes and blast-like respectively (Table 4.1).

III.5. Effects of cadmium on mitochondrial activity

Cadmium exposure did not modulate mitochondrial activity of hyalinocytes and granulocytes (*p* = 0.197; *p* = 0.135 respectively) for all tested concentrations. Significant effects were detected only in blast-like cells at the highest concentration (10^{-3} M) with decrease of 30% compared to non-exposed hemocytes (Figure 4.4 C). Calculated EC_{50} for blast-like cells was 4.86 ± 1.54 x10^{-3} M while non-linear Hill regressions were not fitting on hyalinocyte and granulocyte data.

Tableau 4. 1 : Calculated EC_{50} for endpoints measured after 21 hours of exposure to cadmium. Effective concentration that affect 50% of parameters are expressed in mean ± SEM. Values were compared between endpoints using ANOVA p <0.001 followed by Tukey test. Letters indicate significant differences between endpoints and cell populations.

Sensitivity	Endpoint	Cell population	EC_{50} (M)	
-	Viability	Whole	4.70 ± 1.01 x10^{-3}	A
	Lysosomal content	Granulocytes	3.59 ± 0.67 x10^{-3}	A
	Mitochondrial activity	Blast-like	4.86 ± 1.54 x10^{-3}	AB
	Lysosomal content	Hyalinocytes	2.09 ± 0.57 x10^{-3}	BC
		Blast-like	1.12 ± 0.22 x10^{-3}	CD
	Oxidative activity	Hyalinocytes	9.37 ± 0.88 x10^{-4}	CD
		Blast-like	8.45 ± 1.32 x10^{-4}	CDE
		Granulocytes	7.69 ± 1.25 x10^{-4}	DE
	Phagocytic activity	Granulocytes	6.14 ± 1.19 x10^{-4}	EF
		Hyalinocytes	3.83 ± 0.53 x10^{-4}	FG
	Mean beads/hemocyte	Granulocytes	3.64 ± 0.95 x10^{-4}	G
+		Hyalinocytes	2.64 ± 0.48 x10^{-4}	G

IV. Discussion

The aim of the present work was to assess through analysis of multiple endpoints, differential sensitivity of hemocyte subtype functionalities to cadmium using *ex vivo*

exposure. Our results indicated that cadmium induced weak effects on zebra mussel hemocytes viability only at the highest tested concentration (10^{-3} M). This may be due to multiple parameters such as induction of metallothioneins that provide a protective mechanism against cadmium toxicity. Upregulation of these proteins in response to metal exposure were highlighted in numerous species including *Crassostrea virginica* or *Corbicula fluminea* (Roesijadi 1992; Baudrimont *et al.*, 1999; Butler & Roesijadi 2001). Other studies indicated that cadmium concentration of 3 x10^{-4} M did not affect hemocyte viability in an oyster species (*Crassostrea gigas)* that is consistent with our results (Gagnaire *et al.*, 2004). However, toxicity was observed in hemocytes from *Mya arenaria*, *Mytilus edulis desolationis* and *Aulacomya ater* at 10^{-4} M of cadmium through similar exposure conditions and analysis procedures (Brousseau *et al.*, 2000; Caza *et al.*, 2015). Dose-dependent decrease of viability using XTT assay indicated an EC_{50} around 0.4 x10^{-3} M in hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* after 24 hours of exposure that is more sensitive than our results (Olabarrieta *et al.*, 2001). In the gastropod *Haliotis tuberculata*, it was highlighted that 9 x10^{-4} M of cadmium had no effect on hemocyte viability after short-term exposure while 1000 fold lower concentration were cytotoxic after 10 days of *in vitro* exposure (Latire *et al.*, 2012; Ladhar-Chaabouni *et al.*, 2014). Cadmium cytotoxicity is exerted in a time-dependent manner and hemocyte sensitivity may vary depending on species considered. In addition, we cannot exclude that protocols used may influence result analysis. Indeed, viability assessment performed in some of previously cited studies are based on cell metabolic activity or membrane permeability measurement which may be of a different sensitivity.

In mollusc defenses, phagocytosis is the main mechanism of cell-mediated immune response. Previous studies indicated that endpoints related to this mechanism in bivalves were sensitive approaches to assess heavy metal immunotoxicity (Brousseau *et al.*, 2000; Fournier *et al.*, 2000). In our study, phagocytic activity of hemocytes from *Dreissena polymorpha* was inhibited in a dose-dependent manner and calculated EC_{50} was 6.14 ± 1.19 x10^{-4} M for granulocytes and 3.83 ± 0.53 x10^{-4} M for hyalinocytes. In other studies, similar range of sensitivity were observed in the zebra mussel, *Mytilus edulis desolationis* and *Aulacomya ater* indicating an EC_{50} between 10^{-4} and 10^{-3} M of

cadmium (Sauvé *et al.*, 2002; Caza *et al.*, 2015). Based on results from inter-species comparison study, these species seem to be more sensitive than *Mya arenaria, Elliptio complanata, Mytilus edulis* and *Mactromeris polynyma* whose EC_{50} values were greater than 10^{-3} M of cadmium (Sauvé *et al.*, 2002). Susceptibility differences of immunological cells between species to pollutants are recognized (Salo *et al.*, 2005).

Phagocytosis related endpoints measured in hyalinocytes and granulocytes indicated no difference of sensitivity between the two cell types. This led us to suppose that both cell types may be affected through similar mechanisms. Disturbance of hemocyte phagocytosis due to cadmium exposure was linked to disturbance of cell cytoskeleton. In hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium, actin cytoskeleton was shown to be altered leading to rounded cells without pseudopods (Olabarrieta *et al.*, 2001; Gómez-Mendikute & Cajaraville 2003). Moreover, similar cell morphology changes due to cadmium were observed in hemocytes from *Haliotis tuberculata* (Latire *et al.*, 2012; Ladhar-Chaabouni *et al.*, 2014). Several mechanisms were proposed to explain actin cytoskeleton alteration such as damages related to an increase of ROS production (Gómez-Mendikute *et al.*, 2002). According to our results, this hypothesis cannot be confirmed even if an increase trend appeared in hemocytes oxidative activity at 10^{-4} M, statistical analysis does not allow us to establish a link between the two endpoints (Pearson correlation $p > 0.05$, data not shown). Another hypothesis would be the direct interaction between cadmium and proteins from cytoskeleton or through disturbance of proteins associated with cellular calcium homeostasis (Viarengo & Nicoreta 1991; Matozzo *et al.*, 2001).

As a key mechanism during the phagocytosis process, ROS production originates from endogenous processes that allow killing of phagocytosed pathogen (Lambert *et al.*, 2007b). However, protocol applied here may reveal total ROS production sources, including oxidative stress generated by cadmium ions within the cell. Our results indicated a trend to increase of ROS production at intermediate concentration tested before significant decrease observed with the highest tested concentration. Several studies indicated pro-oxidant effects of cadmium in hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* and *Haliotis tuberculata* with an increase of ROS or RNS generation

(Koutsogiannaki *et al.*, 2006, 2014; Dailianis 2009; Latire *et al.*, 2012; Bouki *et al.*, 2013). Similar results were observed in hemocytes from the oyster *Ostrea edulis* after *in vivo* exposure to cadmium while highest tested concentration induced decrease of ROS-positive cells as observed in our results. In *Crassostrea virginica*, *in vitro* exposure to cadmium also induced a decrease of ROS generation that is also consistent with our results (Roesijadi *et al.*, 1997). In our study, decrease of ROS production may be related to cell death observed at 10^{-3} M. According to Donaghy *et al.*, 2012b, endogenous ROS production in mollusc hemocytes originates mainly from mitochondrial activity. Regarding to our results, mitochondrial activity in hyalinocytes and granulocytes was not impaired by cadmium supposing that cell oxidative metabolism modulations observed in our study may originate from other pathways such as disturbance of antioxidant enzyme activities (Katsumiti *et al.*, 2014; Koutsogiannaki *et al.*, 2014). Even if calculated EC_{50} for oxidative activity were not significantly different between the three hemocyte types, measured effects were different in hyalinocytes and blast-like hemocytes compared to granulocytes for which no effects were observed for tested concentrations of cadmium suggesting higher capacity of granulocytes to regulate oxidative stress.

It is accepted that hemocytes play an active role in metal metabolism through uptake, sequestration or redistribution of metals for physiological processes and detoxification of non-essential metals (Giamberini *et al.*, 1996; Matozzo *et al.*, 2001; Fisher 2004a, 2004b). Indeed, hemocytes are known to accumulate pollutants such as heavy metals in lysosomal compartment (Marigomez *et al.*, 1990, 2002; Einsporn *et al.*, 2009; Ivanina *et al.*, 2014). In our study, decrease of Lysotracker probe fluorescence was observed in the three hemocyte populations depending on cadmium concentration. A reduction of probe accumulation may indicate a loss of acidic organelles in hemocytes and be linked to disruption of lysosomal membrane integrity. In hemocytes of *Haliotis tuberculata*, decrease in fluorescence using similar probe was observed after 10 days of *in vitro* exposure to cadmium (Latire *et al.*, 2012). Other studies indicated adverse effects of cadmium on lysosomal membrane stability using neutral red retention assay in other mollusc species such as *Tapes philippinarum* (Matozzo *et al.*, 2001) and *Mytilus galloprovincialis* (Rocha *et al.*, 2014, Koutsogiannaki *et al.*, 2015). However, according to EC_{50} values calculated in our study, lysosomal content parameter was significantly

less sensitive to cadmium for granulocytes than hyalinocytes while it is similar between hyalinocytes and blast-like. This led us to hypothesize that granulocytes have a greater involvement in essential metal transport or sequestration of heavy metals that is consistent with observations made by Giamberini and coworkers that detected presence of metals in granulocytes of zebra mussels (Giamberini *et al.*, 1996).

Previous work focusing on morphological parameters and functional activities of blast-like cells suggested that they are hemocyte progenitors (Hine *et al.*, 1999; Matozzo *et al.*, 2008, Donaghy *et al.*, 2009a). Our study highlighted adverse effects on mitochondrial activity of blast-like cells that may be of concern. Process leading to blast-like differentiation into other hemocyte types remain unknown but injuries of this cell population could potentially impact overall immune efficiency by not ensuring renewal of hyalinocytes and granulocytes.

In the present study, large zebra mussels were selected to ensure withdrawal of sufficient hemocyte numbers to perform assessment of multiple cadmium concentrations at individual scale. Concerning immunological parameters, no relevant data are available about effects of age on hemocyte sensitivity to contaminants. Only some studies demonstrated that under natural conditions, hemocyte phagocytosis was influenced by individual size in bivalve species such as *Chamalea gallina* (Mosca *et al.*, 2011) and *Hyriopsis cumingii* (Xu *et al.*, 2011) while it was not the case in *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997) and *Perna viridis* (Donaghy *et al.*, 2011). However, immunological parameters are known to be seasonally modulated by physiological status of individuals and affect susceptibility to stresses (Duchemin *et al.*, 2007; Ciacci *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2014). Molluscs were qualified as non-senescing species, implicating that they have no age-related decline in physiological capacity and immune defenses (Finch and Austad 2001; Jemaà *et al.*, 2014). Thus, according to these observations, we may suppose a minimal influence of mussel age on hemocyte sensitivity compared to potential impact of physiological status. In our experiment, animal used were sampled outside their breeding period to minimize confounding effects of this endogenous parameter. However, we cannot exclude that results obtained may

be modulated depending on other factors such as population genetic and origin or environmental pollution present in their environment of origin…

V. Conclusion

Despite its invasiveness that may be associated with tolerance to pollution, this study confirms that zebra mussels constitute a sensitive model to study immunotoxic effects of pollutants in freshwater species. To our knowledge, this study is the first to integrate cell subpopulation scale to investigate modulations of hemocyte functionalities through multi biomarker approach. This is also the first study to highlight sensitivity differences of hemocyte types. This suggest involvement of different toxicological pathways generating adverse effects on integrity of cell components or functions that cells are more or less able to regulate depending on their involvement in mussel physiology. In addition, markers related to phagocytosis mechanism were the most sensitive endpoints among hemocyte functionalities assessed, which confirms that phagocytosis is a fully suitable and sensitive assay to evaluate immunotoxic potential of xenobiotics in an environmental toxicology context (Fournier *et al.*, 2000; Auffret *et al.*, 2005). Previous work demonstrated differences of cell sensitivity during immunotoxicologic assessment in vertebrates depending on lymphoid tissues origin (Fournier *et al.*, 2005). Our results suggest that for molluscs, sensitivity of cell components of hemolymphatic tissue may differ depending on cell population considered.

Acknowledgements

This work was supported by the Champagne-Ardenne Region (France), by the Canadian Chair in Environmental Immunotoxicology, by the CFQCU (Conseil Franco-Québécois de Coopération Universitaire) and by a grant from both ANR and NSERC Agencies (joined France-Canada project) as a part of the research programme IPOC (Interactions between POllution and Climate changes: Development of improved monitoring strategy, ANR-12-ISV7-0004-01, 2013-2015).

Partie 2 : Expérimentations en milieu contrôlé : effets de la température et du pH sur les paramètres hémocytaires et influence sur la résistance au cadmium

I. Introduction

Les milieux aquatiques sont vulnérables aux effets des changements climatiques car ils regroupent une vaste majorité d'organismes ectothermes qui possèdent un rôle clef dans la structuration des écosystèmes (Heugens *et al.*, 2001). Des modifications de température et l'acidification des milieux aquatiques devraient placer certains individus dans des conditions à la limite de leur gamme de tolérance et entrainer des déséquilibres entre les apports et les demandes en oxygène et impacter le métabolisme et la physiologie des organismes (Lannig *et al.*, 2006). Dans l'environnement, le facteur température joue un rôle clef dans la physiologie des organismes ectothermes et notamment les mollusques. Les fluctuations de température dans leur environnement direct vont faire varier de façon concomitante leur température corporelle et entrainer des modulations de toutes les activités physiologiques et des réactions biochimiques (Sokolova & Lannig 2008). En plus d'être ectothermes, les bivalves sont osmoconformes. Les modifications de la composition chimique de leur milieu vont directement influencer leur composition interne, ce qui peut potentiellement affecter les fonctionnalités hémocytaires (Gagnaire *et al.*, 2006). Il a été démontré chez plusieurs espèces de mollusques que ces paramètres vont moduler aussi bien la structuration des populations hémocytaires que leurs fonctionnalités (Voir Chapitre 1, III). Il est donc important de déterminer si ces paramètres constituent des facteurs de confusion dans l'analyse des réponses de nos marqueurs hémocytaires.

Les paramètres environnementaux à eux seuls peuvent constituer une source de stress pour les organismes aquatiques. Dans les milieux naturels, les contaminations anthropiques contribuent à générer des stress supplémentaires auxquels les organismes doivent faire face. Etant donné l'influence directe de la température sur de

nombreux processus physiologiques, des interactions entre ce paramètre et les polluants peuvent être attendues quand le contaminant agit sur ces mêmes processus (Heugens *et al.*, 2002). Les interactions entre ces stress multiples peuvent potentiellement avoir une action synergique et affecter plus grandement la physiologie des mollusques. Il est donc important de comprendre les effets interactifs entre ces paramètres afin d'améliorer la gestion des risques écotoxicologiques.

Ce sujet d'étude rencontre un intérêt croissant en écotoxicologie et la majorité des travaux publiés concernent les effets d'un stress thermique avec un contaminant de la classe des éléments traces métalliques (Holmstrup *et al.*, 2010). Plusieurs études se sont concentrées sur l'effet des paramètres environnementaux sur l'accumulation des polluants. Les changements de température peuvent moduler les activités biologiques de filtration et les processus métaboliques ce qui peut affecter l'accumulation des contaminants. Chez *Perna viridis, Crassostrea virginica* et *Mytilus edulis*, il a été démontré qu'une augmentation de température entrainait une accumulation plus importante du cadmium par les organismes (Baines *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2005 ; Cherkasov *et al.*, 2007 ; Mubiana & Blust 2007). Pour le pH, une diminution de l'accumulation du cadmium a été observée en milieu acidifié chez *Corbicula fluminea*, *Unio pictorum* alors que des effets opposés sont notables chez *Mytilus edulis*, *Tegillarca granosa*, et *Meretrix meretrix* (Graney *et al.*, 1984 ; Pynnönen 1990 ; Shi *et al.*, 2016). Chez des dreissènes exposées en laboratoire, une augmentation de la température a pour conséquence d'augmenter l'accumulation de cadmium alors qu'une réduction du pH engendre un effet opposé (Fraysse *et al.*, 2000).

Plusieurs travaux publiés visaient principalement à déterminer si ces interactions engendraient des atteintes au niveau métabolique chez les mollusques. Ainsi, chez l'huître américaine *Crassostrea virginica*, une élévation de la température est responsable d'une induction de l'expression des protéines de stress HSP et métallothionéines ainsi qu'une augmentation de sensibilité du métabolisme mitochondrial au cadmium. Ces effets se traduisent par une demande plus importante en oxygène et une inhibition plus précoce de l'activité respiratoire ainsi qu'une diminution du gradient de proton (Sokolova 2004, Cherkasov *et al.*, 2006, Ivanina *et al.*,

2009). La combinaison de ces deux stress engendre également une mortalité plus importante pouvant résulter de ces perturbations métaboliques (Lannig *et al.*, 2006). Chez *Mytilus galloprovincialis*, il a été observé qu'à de faibles températures, le cadmium entraine une déstabilisation importante des membranes lysosomales au niveau de la glande digestive. Le stress thermique à lui seul entraine un élargissement des lysosomes alors qu'en présence des deux stress, l'effet du cadmium se trouve masqué par celui du stress thermique (Izagirre *et al.*, 2014). Chez la moule zébrée, il a été observé qu'une augmentation de la température génère des perturbations métaboliques entrainant une plus forte sensibilité à la toxicité du cuivre se traduisant par des CL_{50} (96h) plus basses à 25°C qu'à 20°C (Rao & Khan 2000).

Dans l'environnement, la biodisponibilité et la toxicité des métaux peuvent varier selon leur état de spéciation qui est définit par les différentes formes physiques ou chimiques que prennent ces composés (Templeton *et al.*, 2000). La spéciation chimique d'un métal dissous dépendra de son affinité pour les divers ligands disponibles mais aussi du pH et de la température. De ce fait, la spéciation chimique des métaux variera d'un milieu à l'autre en fonction de ces paramètres et pourra prendre des formes plus ou moins toxiques selon le contexte environnemental (Campbell & Couillard 2004 ; Holmstrup *et al.*, 2010 ; Izagirre *et al.*, 2014). De ce fait, la réalisation d'expositions *in vivo* des individus au cadmium dans différentes conditions de températures et de pH pourrait entrainer des modulations des effets toxiques générés en partie par des différences de spéciation du métal. Pour nos expérimentations, nous avons donc fait le choix de réaliser une exposition *in vivo* des animaux à différentes conditions de température et de pH avant d'exposer les cellules hémocytaires au cadmium. L'utilisation de cette seconde exposition permet de révéler les modulations d'effets toxiques associés aux perturbations de la composante physiologique générées par les fluctuations de température et de pH.

Le premier objectif des travaux regroupés dans ce chapitre est d'estimer si des modifications des paramètres physico-chimiques de l'eau (température et pH) vont moduler les paramètres hémocytaires structuraux et les réponses fonctionnelles des trois sous-populations hémocytaires. Le second objectif est d'évaluer au travers d'une

approche « stress on stress », si les changements de paramètres physico-chimiques vont affecter la physiologie de l'espèce de façon à influencer la capacité des cellules hémocytaires à surmonter un stress chimique supplémentaire lors d'une exposition *ex vivo.*

Afin de répondre à ces objectifs, des expérimentations *in vivo* ont été mises en place dans le cadre du programme ANR-CRSNG IPOC. La collaboration avec le Biodôme de Montréal a permis d'avoir à disposition un système expérimental permettant de faire évoluer avec précision les paramètres de température et de pH dans les eaux de stabulation des moules zébrées.

II. Matériels et méthodes

II.1. Prélèvements des moules

Les moules zébrées *Dreissena sp*. (Longueur : 24,09 ± 2,2 mm ; Poids : 1736 ± 475 mg) ont été prélevées début septembre 2014 dans le canal de Soulanges au niveau de la communauté de Pointe-des-Cascades (45°19'49.9"N, -73°58'11.8"W) au Québec. Ce site, localisé dans le tronçon fluvial du Saint-Laurent, a été choisi car il est situé en amont des grandes agglomérations québécoises pouvant constituer une source de rejets de pollutions. Pointe-des-Cascades se situe en amont de la confluence entre le fleuve Saint-Laurent et la rivière des Outaouais à l'ouest de Montréal (Figure 4.5). Lors d'une campagne menée en 2013 dans le cadre du programme IPOC, les analyses chimiques menées par le CEAEQ ont révélé que parmi les sites échantillonnés, celui-ci présentait le plus faible taux de contamination par les contaminants organiques. Des informations complémentaires sur ce site sont disponibles dans le chapitre 5 de la thèse. Lors des prélèvements, les animaux ont été détachés du substrat par section du byssus. Les conditions de température et de pH mesurées dans l'eau étaient de 20°C et pH 8 ce qui constitue nos valeurs de référence de conditions terrain (FC).

Figure 4. 5 : Localisation du site de Pointe-des-Cascades où ont été prélevées les moules zébrées.

II.2. Système et conditions expérimentales

Après avoir été prélevées, les moules ont été transportées au Biodôme de Montréal et placées dans des bassins de stabulation à des conditions de température et de pH de l'eau identiques à celles mesurées sur le terrain à Pointe-des-Cascades (T°C : 20 ± 0,3°C, pH : 8 ± 0.04). Les expérimentations de stress thermique et de pH ont été réalisées de façons successives. Lors de la première expérimentation, un lot de moule du stock prélevé sur le terrain a été conservé dans un bassin indépendant dans ces mêmes conditions avant d'être utilisé pour la seconde expérimentation. Ces moules réservées pour la seconde expérimentation ont été nourries trois fois par semaine avec une solution algale (Kent Phytoplex).

Pour les expérimentations, les individus ont été répartis entre 4 bacs contenant 100 litres d'eau déchlorée de conductivité 367,3 ± 27,9 µS/cm en système fermé oxygéné

par une pompe à air. Chaque bac était équipé de façon indépendante d'un système de régulation de température et de pH ainsi que d'un système de filtration et d'oxygénation (Figure 4.6). Lors de l'exposition, les animaux ont été placés à l'obscurité et n'ont pas été alimentés afin de ne pas altérer la qualité de l'eau par la dégradation des algues.

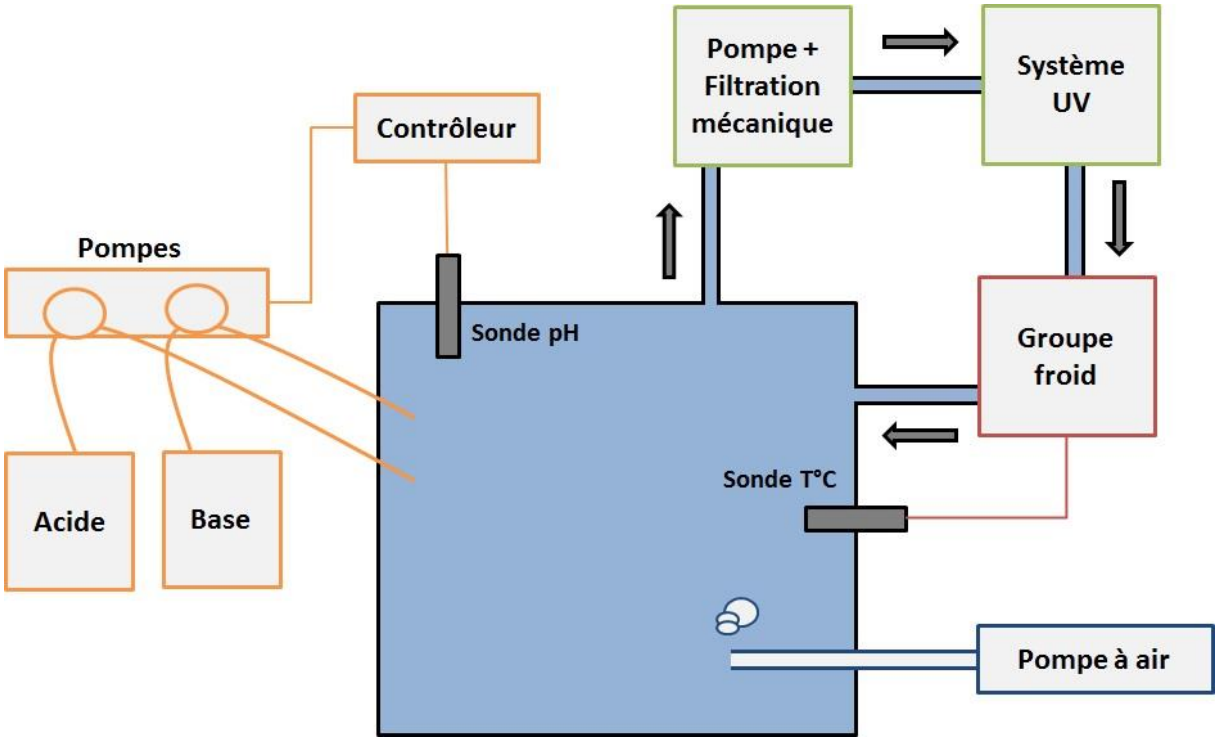


Figure 4. 6 : Système expérimental pour le maintien des moules zébrées et système de régulation de la température et du pH. Encadrés vert : système de filtration et stérilisation de l'eau. Encadrés rouge : système de régulation de la température. Encadrés orange : système de régulation du pH, encadré bleu : système d'oxygénation. Une pompe permet l'extraction d'eau du bac pour l'acheminer vers une première filtration mécanique (Fluval 306) puis un stérilisateur UV (Turbo-twist UV Sterilizer). La température de l'eau est ensuite ajustée par un groupe froid équipé d'un thermostat avant de retourner dans le bac. Le contrôle du pH est assuré par des sondes reliées à un boitier numérique (Profilux 3) programmé pour ajuster le pH de l'eau par injection d'acide (H_2SO_4 0,05 M) ou de base (NaOH 0,05 M) dans le bac *via* un système de pompes péristaltiques. Les injections étaient programmées pour effectuer des pulses

d'acide ou de base de 10 secondes toutes les 5 minutes. Les photos du système expérimental sont placées en Annexe 2.

Après 7 jours d'acclimatation, un premier prélèvement de moules a été réalisé de façon aléatoire dans les quatre bacs (T0). Selon l'expérimentation, les modifications de température ou de pH ont été réalisées progressivement pendant 7 jours avant de procéder à un second prélèvement (T7). Les moules ont ensuite été maintenues à ces nouvelles conditions pendant trois semaines avant de réaliser un troisième prélèvement (T28).

Pour le stress thermique, le pH de tous les bacs a été maintenu à 8 alors que la température de l'eau a été modifiée graduellement pendant 7 jours pour atteindre 25 ± 0.17°C, 15 ± 0.16°C et 4 ± 0.11°C pendant que la température du dernier bac restait constante à 20 ± 0.12°C (Figure 4.7 A).

Pour le stress de pH, la température de tous les bacs a été maintenue à 20°C alors que le pH a été progressivement diminué pendant 7 jours pour atteindre 7.6 ± 0.08, 6.9 ± 0.1 et 6.4 ± 0.12 pendant que le pH du dernier bac restait constant à 8 ± 0.04 (Figure 4.7 B).

Pour chaque point de prélèvement, 30 moules ont été récupérées par condition : 12 moules étaient réservées à l'analyse des marqueurs structuraux et fonctionnels hémocytaires et 18 moules permettaient d'analyser la sensibilité du mécanisme de phagocytose au cadmium lors d'expositions *ex vivo*.

II.3. Prélèvements d'hémolymphe et paramètres structuraux

L'hémolymphe des moules a été prélevée par ponction dans le muscle adducteur à l'aide d'une seringue de 1 mL montée avec une aiguille de 30G avant d'être transférée dans des micro-tubes de 1,5mL. La concentration cellulaire est déterminée à l'aide d'un hématimètre de Malassez. La proportion en hyalinocytes, granulocytes et blast-like a été déterminée à partir des paramètres de taille et de complexité mesurés en FSC-H et SSC-H lors des analyses de cytométrie de flux.

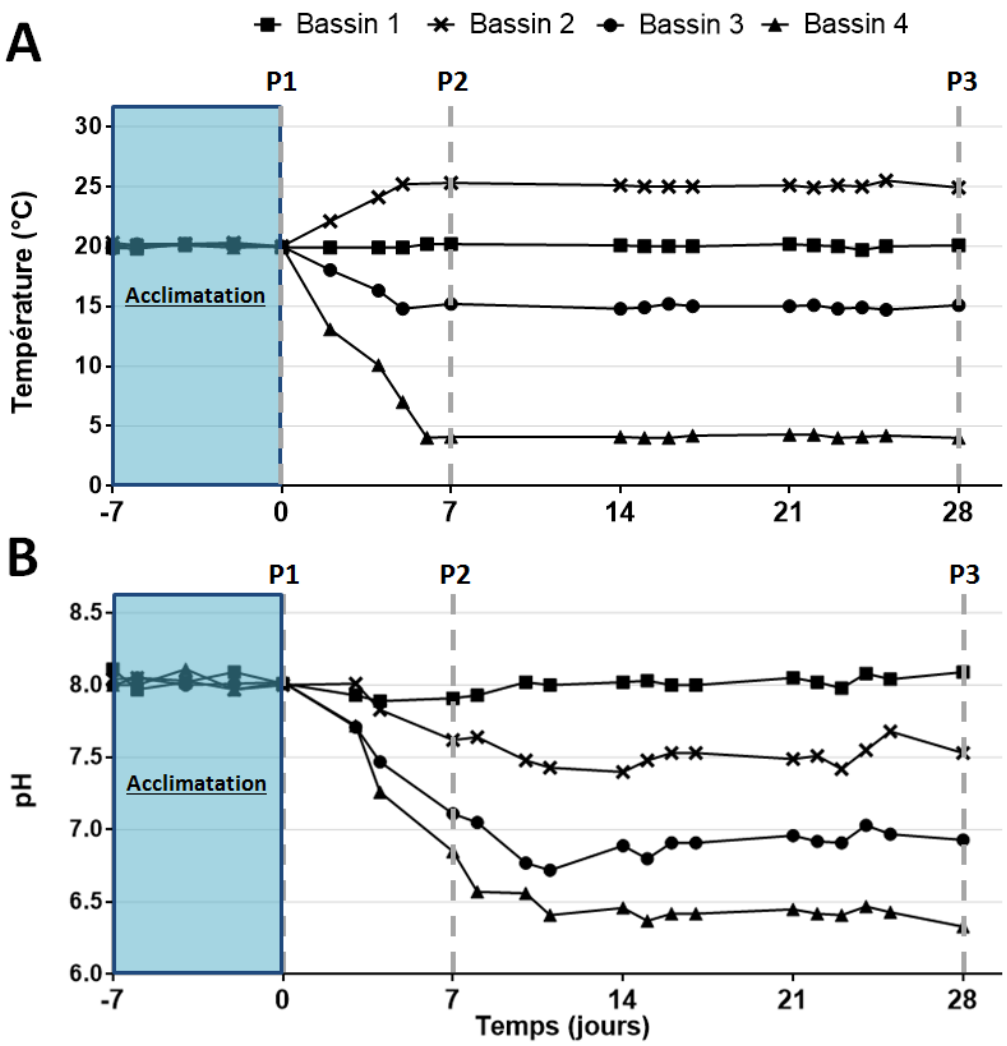


Figure 4. 7 : A : Suivi des températures lors de l'expérimentation de stress thermique. B : Suivi du pH lors de l'expérimentation de stress de pH. P1, P2 et P3 indiquent les prélèvements réalisés pendant l'expérimentation.

II.4. Analyse des marqueurs hémocytaires

Pour l'analyse des marqueurs hémocytaires, après numération, les cellules ont été transférées dans des tubes de cytométrie de 5mL à une densité de 200 000 c.mL^{-1} par dilution avec du milieu L15-15% (50 000 cellules dans 250 µL) (Cf chapitre 2). Pour chaque individu (N=12), 5 tubes ont été préparés afin d'analyser la viabilité hémocytaire,

l'activité de phagocytose, l'activité oxydative, le contenu en lysosomes et l'activité mitochondriale. Les protocoles utilisés sont ceux détaillés dans le chapitre 2 de ce mémoire et regroupés en Annexe 1.

II.5. Expositions *ex vivo* des hémocytes au cadmium

Pour l'analyse de la sensibilité des hémocytes au cadmium, les cellules ont été exposées à des concentrations croissantes en cadmium : 0, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 5.10^{-4}, 10^{-3} M. Après prélèvement, des pools d'hémolymphe de trois individus ont été réalisés (N=6) avant comptage de la concentration cellulaire avec un hématimètre de Malassez. À partir de chaque pool, 12 tubes étaient préparés de façon identique à l'analyse des marqueurs hémocytaires du paragraphe précédent. Six tubes étaient réservés pour l'analyse de la viabilité et les six autres étaient dédiés à l'analyse de l'activité de phagocytose. Pour l'exposition, les solutions de cadmium ($CdCl_2$ 2,5 H_2O) ont été préparées dans le milieu de maintien des hémocytes de dreissène.

Les hémocytes ont été placés en incubation pendant une durée totale de 21 heures à 16°C et à l'obscurité avant analyse. Pour l'activité de phagocytose, les cellules ont été incubées avec le cadmium pendant 3 heures avant l'ajout des billes fluorescentes. L'incubation a ensuite été poursuivie pour 18 heures supplémentaires comme déterminé dans le chapitre 2. A l'issue de l'exposition, les échantillons ont été centrifugés sur un gradient de BSA à 3% pour éliminer les billes excédentaires non phagocytées avant fixation des cellules (0,5% v/v formaldéhyde et 2 $g.L^{-1}$ de sodium azide). Les échantillons ont été conservés à 4°C afin de répartir les analyses en cytométrie sur 48 heures. Les échantillons dédiés au suivi de viabilité ont été analysés en cytométrie de flux dès la fin de l'incubation en utilisant l'iodure de propidium à une concentration finale de 10 $\mu g.mL^{-1}$.

II.6. Statistiques

L'analyse des tests statistiques a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica 8.0. Le test de Kolmogorov-Smirnov est utilisé afin de tester la normalité de distribution des données et l'homogénéité des variances avec le test de Levene. Certaines données ont été transformées afin de remplir les conditions de normalité et d'homoscédasticité. Une première ANOVA est appliquée afin de comparer, pour chaque temps d'exposition (T7 et T28), s'il existe des différences entre les conditions de température ou de pH. Une seconde ANOVA est ensuite réalisée pour chaque condition afin de déterminer s'il existe des différences dans le temps. Si des différences sont avérées ($p < 0,05$), un test post-hoc de Tukey est réalisé. Pour le test de sensibilité au cadmium, les données ne présentant pas une distribution normale, une démarche équivalente a été utilisée mais à l'aide de tests statistiques non paramétriques : Kruskal-Wallis (K-W) suivi d'un test de comparaison multiple des rangs. Les données sont présentées par leur valeur moyenne ± écart type.

III. Résultats : Stress thermique et réponses hémocytaires

III.1. Paramètres hémocytaires structuraux

III.1.1. Concentration hémocytaire

Lors de l'expérimentation, la concentration hémocytaire moyenne mesurée chez les moules était comprise entre 0,92 et 1,21 $x10^6$ cellules.mL^{-1} (Tableau 4.2). Aucun changement de ce paramètre n'a été observé entre les différentes conditions thermiques aux deux temps de prélèvements (ANOVA T7 : $p = 0,053$; T28 : $p = 0,666$).

III.1.2. Distribution hémocytaire

La distribution hémocytaire est significativement différente pour les trois types hémocytaires à T7 pour la condition dont la température passe de 20 à 4°C (ANOVA

Hy : p = 0,027 ; Gr : p = 0,045 ; Blast-like : p = 0,000). A cette température, le taux de hyalinocytes et de granulocytes diminue significativement alors que celui des hémocytes blast-like augmente (Tableau 4.2). Au 28ème jour, cet effet n'est plus présent (ANOVA Hy : p = 0,113 ; Gr : p = 0,746 ; BL : p = 0,083) et pour la condition à 4°C, la distribution n'est pas significativement différente du T0.

III.1.3. Viabilité cellulaire

La viabilité hémocytaire moyenne mesurée sur l'ensemble de l'expérimentation est de 73,7 ± 10,8%. Une viabilité significativement inférieure à la condition du terrain (FC) est notable à T7 (ANOVA p = 0,025) pour les moules exposées à la température de 4°C (Tableau 4.2). Cet effet n'est plus présent après 3 semaines passé à cette température (T28) et la viabilité hémocytaire est similaire à celle observée à T0 avant les changements de température.

Tableau 4. 2 : Paramètres hémolymphatiques structuraux mesurés lors de l'expérimentation de stress thermique. Les données sont présentées par leur valeur moyenne ± écart type. Les lettres majuscules en gras correspondent aux groupes homogènes entre les conditions pour un même temps.

Paramètres	**Type cellulaire**	**Temps**	**Conditions thermiques**			
			FC (20°C)	**25°C**	**15°C**	**4°C**
Concentration hémocytaire ($x10^6$ cellules.mL^{-1})		0	1,10 ± 0,27	-	-	-
		7	1,21 ± 0,23	1,19 ± 0,3	1,13 ± 0,2	0,92 ± 0,25
		28	1,04 ± 0,23	0,96 ± 0,21	0,98 ± 0,20	0,94 ± 0,22
Distribution hémocytaire (%)	Hy	0	43,43 ± 12,76	-	-	-
		7	48,43 ± 21,26 **AB**	40,74 ± 17,9 **AB**	49,8 ± 20,03 **A**	25,66 ± 5,69 **B**
		28	47,07 ± 21,23	35,24 ± 16,05	36,34 ± 19,83	51,90 ± 17,59
	Gr	0	15,38 ± 3,33	-	-	-
		7	22,79 ± 11,88 **A**	20,21 ± 10,60 **AB**	16,02 ± 5,58 **AB**	11,36 ± 3,98 **B**
		28	18,25 ± 6,72	20,9 ± 7,20	18,04 ± 8,79	17,59 ± 8,15
	BL	0	41,19 ± 11,95	-	-	-
		7	28,79 ± 13,35 **A**	39,05 ± 13,11 **A**	34,18 ± 16,09 **A**	62,98 ± 8,78 **B**
		28	34,68 ± 18,35	43,86 ± 14,36	45,62 ± 17,16	30,51 ± 12,49
Viabilité hémocytaire (%)		0	74,88 ± 9,11	-	-	-
		7	78,38 ± 14,49 **A**	77,24 ± 10,26 **A**	71,44 ± 11,77 **AB**	63,33 ± 9,15 **B**
		28	76,45 ± 8,76	73,09 ± 9,07	70,64 ± 11,52	75,19 ± 8,26

III.2. Paramètres fonctionnels hémocytaires

III.2.1. Activité de phagocytose

L'analyse des marqueurs fonctionnels en lien avec la phagocytose indique qu'à l'issue des changements de température (T7), le taux de phagocytose des granulocytes est significativement inférieur pour les moules passées de 20°C (FC) à 4°C (Tableau 4.3). Pour les hyalinocytes, le taux de phagocytose n'est pas affecté à T7 mais le nombre moyen de billes phagocytées par ce type cellulaire est significativement inférieur pour la condition 4°C. Cet effet est absent pour le nombre moyen de billes mesuré pour les granulocytes à T7 (p = 0,139). A T28, aucune différence significative n'est notable entre les conditions de température pour les deux marqueurs de phagocytose. On notera cependant que les taux de phagocytose mesurés sont significativement inférieures à T28 comparativement à T0 et T7 quel que soit la condition de température (Tableau 4.3). Le nombre moyen de billes phagocytées par les granulocytes est inférieur à T28 par rapport à T0 dans les conditions témoins uniquement.

III.2.2. Activité oxydative

Pour l'activité oxydative hémocytaire, aucune modulation n'est notable pour les hyalinocytes dans les différentes conditions thermiques testées et aux différents temps de prélèvements. Pour les granulocytes, l'activité oxydative mesurée est significativement supérieure à 15°C comparé aux conditions du terrain à T28 (Tableau 4.3). On note une diminution significative de cette activité dans le temps pour les granulocytes uniquement dans le cas des conditions terrain (p = 0,008). Pour les hémocytes blast-like, l'activité oxydative mesurée à T28 est significativement supérieure chez les individus soumis à la température de 15°C par rapport aux conditions de terrain bien qu'aucun effet significatif ne soit mesurable si l'on considère l'évolution de ce paramètre dans le temps pour chaque condition thermique (Tableau 4.3).

Tableau 4. 3 : Paramètres fonctionnels hémocytaires mesurés dans le cadre de l'expérimentation de stress thermique. *Les résultats sont exprimés par leur valeur moyenne ± écart type. Les lettres majuscules indiquent les groupes homogènes entre les conditions thermiques pour un temps considéré et les lettres en minuscules indiquent les groupes homogènes pour chaque condition thermique entre les temps d'expositions.*

Paramètres	**Type cellulaire**	**Temps**	**Conditions thermiques**			
			FC (20°C)	**25°C**	**15°C**	**4°C**
Taux de phagocytose (%)	Hy	0	75,80 ± 8.82 ***a***	- ***a***	- ***a***	- ***a***
		7	68,63 ± 20,13 ***a***	64,22 ± 10,64 ***a***	70,34 ± 10,56 ***a***	57,70 ± 16,54 ***b***
		28	48,23 ± 13,23 ***b***	46,39 ± 15,96 ***b***	57,91 ± 12,15 ***b***	48,98 ± 14,50 ***b***
	Gr	0	52,54 ± 16,81 ***a***	- ***a***	- ***a***	- ***a***
		7	53,21 ± 25,29 **A** ***a***	39,08 ± 16,75 **AB** ***a***	52,91 ± 17,17 **A** ***a***	29,17 ± 18,72 **B** ***b***
		28	24,27 ± 9,01 ***b***	23,27 ± 13,86 ***b***	35,67 ± 14,74 ***b***	24,18 ± 10 ***b***
Nombre moyen de billes	Hy	0	43,24 ± 27,5	- ***a***	-	-
		7	40,38 ± 17,25 **AB**	33,30 ± 23,05 **AB** ***b***	45,29 ± 18,71 **A**	22,30 ± 15,04 **B**
		28	25,49 ± 15,79	25,07 ± 9,14 ***ab***	35,51 ± 16,71	34,31 ± 21,7
	Gr	0	46,15 ± 24,81 ***a***	-	-	-
		7	43,25 ± 25,62 ***ab***	30,24 ± 21,44	37,38 ± 19,72	20,85 ± 18,43
		28	22,39 ± 12,36 ***b***	28,34 ± 15,63	34,44 ± 24,04	28,37 ± 20,09
Activité oxydative (U.A.)	Hy	0	1693,5 ± 2424,1	-	-	-
		7	1863,4 ± 2977,9	1720,3 ± 2463,1	2241,3 ± 2584,6	1497,3 ± 2330,6
		28	544,5 ± 303,3	1330,4 ± 1020,9	1370,8 ± 889,5	2499,2 ± 3198,0
	Gr	0	501,1 ± 656,1 ***a***	-	-	-
		7	527,6 ± 754,9 ***a***	303,4 ± 295,9	272,7 ± 299,2	456,7 ± 446,2
		28	80,9 ± 48,6 **A** ***b***	153,7 ± 94,2 **AB**	358,9 ± 495,3 **B**	805 ± 1017,6 **AB**
	BL	0	32,08 ± 47,18	-	-	-
		7	40,54 ± 63,71	34,17 ± 34,22	67,25 ± 109,5	58,2 ± 60,15
		28	9,75 ± 7,20 **A**	22,63 ± 23,06 **AB**	54,54 ± 54,84 **B**	68,75 ± 129,92 **AB**

Tableau 4.3 : *Suite*

Paramètres	Type cellulaire	Temps	Conditions thermiques							
			FC (20°C)		25°C		15°C		4°C	
Contenu en lysosomes (U.A.)	Hy	0	97,65 ± 22,44	***a***	-	***a***	-		-	***a***
		7	193,72 ± 68,18 **A**	***b***	116,01 ± 78,85 **B**	***a***	120,4 ± 47,25 **B**		106,92 ± 40,19 **B**	***ab***
		28	167,04 ± 51,25 **AB**	***b***	200,37 ± 62,49 **A**	***b***	93,03 ± 34,58 **B**		240,98 ± 135,5 **A**	***b***
	Gr	0	111,46 ± 41,57	***a***	-		-		-	
		7	182,17 ± 51,35 **A**	***b***	135,63 ± 67,66 **AB**		86,15 ± 17,31 **B**		95,68 ± 38,98 **B**	
		28	123,55 ± 50,9	***a***	98,92 ± 35,93		98,79 ± 37,80		129,41 ± 51,44	
	BL	0	16,41 ± 7,83	***a***	-		-		-	
		7	22,02 ± 3,82	***b***	18,12 ± 2,73		21,17 ± 3,24		19,93 ± 4,32	
		28	21,09 ± 6,08 **A**	***b***	16,36 ± 2,27 **AB**		15,67 ± 2,07 **B**		20,53 ± 6,84 **AB**	
Activité mitochondriale (U.A.)	Hy	0	58,40 ± 14,71	***a***	-	***a***	-		-	***a***
		7	110,21 ± 36,08 **A**	***b***	93,33 ± 32,84 **AB**	***b***	72,44 ± 23,41 **B**		79,9 ± 17,2 **AB**	***a***
		28	90 ± 34,3 **AB**	***b***	84,57 ± 29,04 **AB**	***ab***	64,07 ± 24,42 **B**		113,41 ± 37 **A**	***b***
	Gr	0	118,22 ± 30,31		-	***a***	-		-	***a***
		7	162,4 ± 35,56 **A**		157,16 ± 37,95 **AB**	***b***	120,1 ± 31,5 **B**		150,69 ± 42,89 **AB**	***ab***
		28	143,76 ± 54,43 **A**		125,65 ± 32,10 **A**	***ab***	133,40 ±34,56 **A**		195,69 ± 48,05 **B**	***b***
	BL	0	28,34 ± 10,31	***a***	-	***a***	-		-	***a***
		7	52,93 ± 18,80 **A**	***b***	40,38 ± 9,68 **AB**	***b***	38,58 ± 12,70 **AB**		32,53 ± 8,47 **B**	***ab***
		28	42,64 ± 15,73	***ab***	30,90 ± 7,81	***ab***	32,03 ± 12,49		43,04 ± 12,26	***b***

III.2.3. Contenu en lysosomes

La mesure du contenu cellulaire en lysosomes dans les hyalinocytes indique une augmentation significative entre le T0 et le T7 dans les conditions témoins. Cet effet est également présent dans les conditions thermiques à 25°C et 4°C, mais uniquement à T28 (Tableau 4.3 suite). Dans la condition témoins, le contenu en lysosomes des granulocytes augmente significativement entre T0 et T7 mais cet effet est transitoire et les niveaux mesurés à T0 et T28 sont comparables (Tableau 4.3 suite). Toujours pour les granulocytes, à T7 on note que le contenu en lysosomes est supérieur dans les conditions témoins comparé aux moules placées à 15°C et 4°C. Pour les hémocytes blast-like, les valeurs mesurées augmentent sensiblement au cours du temps pour les moules maintenues aux conditions de terrain (FC). A T28 on note un contenu en lysosomes significativement inférieur pour les moules placées à 15°C comparé aux conditions de terrain (Tableau 4.3 suite).

III.2.4. Activité mitochondriale

L'activité mitochondriale mesurée dans les conditions témoins est stable dans le temps pour les granulocytes alors qu'elle augmente de façon transitoire pour les hyalinocytes et les hémocytes blast-like. A T7 on note une diminution significative d'activité mitochondriale dans les granulocytes et hyalinocytes des moules placées à 15°C. Un effet similaire est retrouvé pour les blast-like dans la condition de 4°C (Tableau 4.3 suite). A T28, cet effet n'est plus présent pour aucun des types hémocytaires mais l'activité mitochondriale des granulocytes est significativement supérieure à 4°C par rapport aux conditions terrain.

III.3. Sensibilité du mécanisme de phagocytose au cadmium

La sensibilité du mécanisme de phagocytose est déterminée à partir du calcul des CE_{50} permis par l'obtention de réponses dose-dépendantes du marqueur de phagocytose

après exposition des cellules hémocytaires au cadmium (Cf Chapitre 4 partie 1). Pour les mesures réalisées sur les hyalinocytes, aucune différence n'est présente entre les conditions à T7 (KW : p = 0,366) avec une CE_{50} moyenne de 2,77 ± 2 $x10^{-4}$ M. A T28, une valeur de CE_{50} plus faible est observable chez les moules exposées à 25°C comparé à celles placées à 15°C et 4°C, ce qui traduit une sensibilité plus importante à 25°C (Figure 4.8 A). Dans ces deux conditions, la sensibilité du mécanisme de phagocytose au cadmium diminue dans le temps (K-W : 15°C : p = 0,005 ; 4°C : p = 0,006). La concentration entrainant l'inhibition de 50% de l'activité phagocytaire des granulocytes n'est pas significativement affectée quel que soit la condition thermique et le temps de prélèvement (Figure 4.8 B).

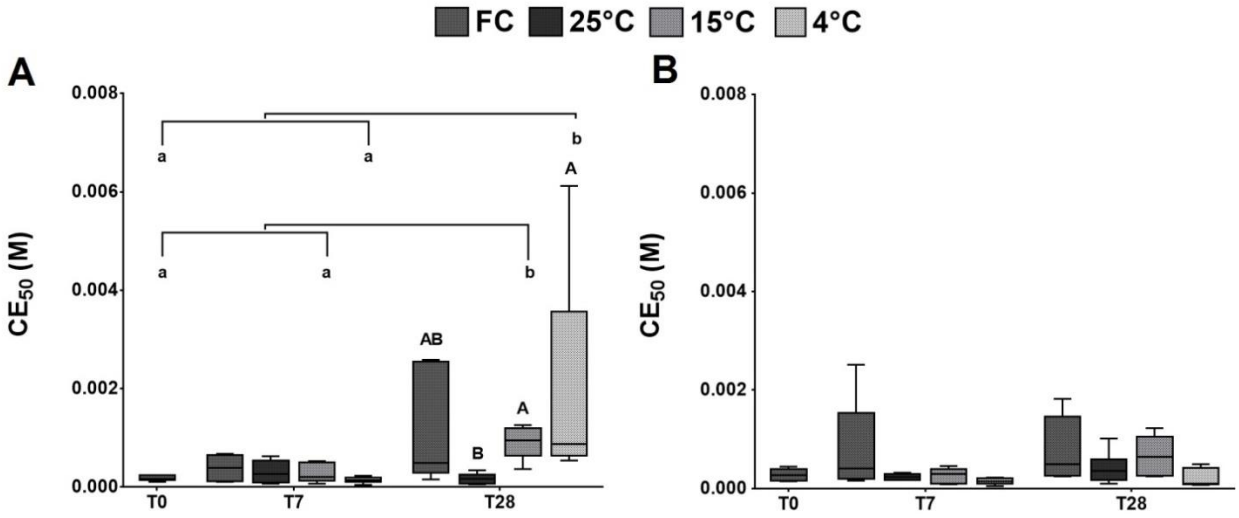


Figure 4. 8 : CE_{50} calculées pour l'activité de phagocytose (A) des hyalinocytes et (B) des granulocytes à l'issue de 21 heures d'exposition au cadmium lors de l'expérimentation de stress thermique. *Les lettres majuscules indiquent les groupes homogènes entre les conditions pour un même temps et les lettres minuscules les groupes homogènes pour une même condition dans le temps.*

IV. Résultats : Stress de pH

IV.1. Paramètres hémocytaires structuraux

IV.1.1. Concentration hémocytaire

Au cours de l'expérimentation, la concentration hémocytaire mesurée dans l'hémolymphe des individus prélevés s'avère être similaire entre les conditions à l'issue des changements de pH (T7 : p = 0,057) (Tableau 4.4). À T28, la concentration hémocytaire dans les conditions de pH 7.5 et 6.4 est significativement supérieure au témoin (FC) (ANOVA p = 0,028).

IV.1.2. Distribution hémocytaire

La proportion représentée par les cellules hyalinocytaires au sein de l'hémolymphe est d'environ 40% à T0 et cette valeur est significativement inférieure à T28 dans la condition de pH 6.9. Le taux de granulocytes augmente significativement dans le temps pour toutes les conditions de pH testées (Tableau 4.4). A T7, le taux de granulocytes est significativement moins élevé pour les moules exposées aux pH 6.9 et 6.4. Cet effet est absent à T28 où le taux de granulocytes mesuré est similaire dans les différentes conditions testées. Pour les hémocytes blast-like, leur taux diminue significativement dans le temps pour la condition témoin (p = 0,038). A T7, la proportion de blastes est inférieure pour les moules placées au pH 7.5 et 6.9 alors qu'à T28, seule les moules soumises au pH 6.9 présentent un taux de blastes supérieur aux autres conditions.

IV.1.3. Viabilité cellulaire

La viabilité hémocytaire moyenne mesurée sur l'ensemble de cette expérimentation est de 67,6 ± 10,5 %. Aucune différence significative n'est notable quelle que soit la condition de pH et le temps de prélèvement (Tableau 4.4).

Tableau 4. 4 : Paramètres hémolymphatiques structuraux mesurés lors de l'expérimentation de stress de pH. Les données sont présentées par leur valeur moyenne ± écart type. Les lettres majuscules en gras correspondent aux groupes homogènes entre les conditions pour un même temps. Les lettres en minuscule correspondent aux groupes homogènes pour une même condition entre les temps de prélèvement.

Paramètres	**Type cellulaire**	**Temps**	**Conditions de pH**			
			FC (pH 8)	**pH 7.5**	**pH 6.9**	**pH 6.4**
Concentration hémocytaire ($x10^6$ cellules.mL^{-1})		0	0,9 ± 0,17 ***a***	-	-	- ***a***
		7	0,63 ± 0,23 ***b***	0,85 ± 0,17	0,69 ± 0,22	0,83 ± 0,31 ***a***
		28	0,77 ± 0,33 **A** ***ab***	1,08 ± 0,40 **BC**	0,83 ± 0,29 **AB**	1,17 ± 0,42 **C** ***b***
Distribution hémocytaire (%)	Hy	0	40,13 ± 24,01			
		7	36,95 ± 16,6	28,22 ± 11,3	36,82 ± 13,56	43,15 ± 25,50
		28	48,89 ± 17,56 **AB**	34,53 ± 17 **BC**	28,13 ± 14,40 **C**	48,32 ± 11,5 **A**
	Gr	0	11,87 ± 4,73 ***a***	- ***a***	- ***a***	- ***a***
		7	28,44 ± 7,27 **A** ***b***	23,49 ± 4,06 **AB** ***b***	15,76 ± 7,10 **C** ***a***	19,85 ± 12,74 **BC** ***b***
		28	24,54 ± 9,07 ***b***	27,91 ± 5,72 ***c***	23,44 ± 7,36 ***b***	19,56 ± 6,01 ***b***
	BL	0	48 ± 20,85 ***a***	-	-	-
		7	34,61 ± 13,55 **A** ***b***	48,30 ± 10,51 **B**	47,41 ± 10,21 **B**	37 ± 19,44 **AB**
		28	29,56 ± 12,06 **A** ***b***	37,56 ± 14,75 **A**	48,43 ± 43,80 **B**	32,12 ± 7,79 **A**
Viabilité hémocytaire (%)		0	64,59 ± 15,23	-	-	-
		7	70,70 ± 11,03	62,49 ± 10,29	70,92 ± 7,77	68,23 ± 9,27
		28	71,81 ± 7,32	69,47 ± 11,32	62,83 ± 10,92	67,23 ± 6,81

IV.2. Paramètres fonctionnels hémocytaires

IV.2.1. Activité de phagocytose

Les taux moyen d'hémocytes ayant phagocyté au moins 3 billes, mesurés lors de l'expérimentation sont de 57,37 ± 14,36% pour les hyalinocytes et 42,38 ± 17,75% pour les granulocytes. Ce paramètre n'a pas été modulé par les différentes conditions de pH testées lors de l'expérimentation (Tableau 4.5). Le nombre moyen de billes phagocytées pour les hyalinocytes et les granulocytes augmente dans les différentes conditions dans le temps mais aucune différence significative n'apparait entre les conditions (T7 : Hy : p = 0,953 Gr : p = 0,454 ; T28 : Hy : p = 0,087 Gr : p = 0,202).

IV.2.2. Activité oxydative

L'activité oxydative mesurée dans les trois types hémocytaires n'est pas modulée par les conditions de pH testées quel que soit le temps d'exposition (Tableau 4.5).

IV.2.3. Contenu en lysosomes

La mesure du contenu en lysosomes indique qu'à T7, les niveaux de ce marqueur mesuré dans les hyalinocytes sont inférieurs aux conditions témoins pour les pH de 7.5 et 6.4. Cet effet n'est plus présent à T28 pour ce type cellulaire (ANOVA p = 0,093). Le contenu en lysosomes des granulocytes est stable dans le temps pour les conditions de pH de terrain, 7.5 et 6.4 alors qu'au pH de 6.9 il augmente à T28 pour atteindre une valeur significativement supérieure aux autres conditions (Tableau 4.5 suite). La mesure de ce marqueur dans les cellules blast-like indique qu'à T28, les valeurs obtenues pour les moules exposées aux différentes conditions de pH sont toutes supérieures à celle de la condition témoin (p < 0,001) (Tableau 4.5 suite).

Tableau 4. 5 : Paramètres fonctionnels hémocytaires mesurés dans le cadre de l'expérimentation de pH. *Les résultats sont exprimés par leur valeur moyenne ± écart type. Les lettres majuscules indiquent les groupes homogènes entre les conditions thermiques pour un temps considéré et les lettres en minuscules indiquent les groupes homogènes pour chaque condition thermique entre les temps d'expositions.*

Paramètres	**Type cellulaire**	**Temps**	**Conditions de pH**							
			FC (pH 8)		**pH 7.5**		**pH 6.9**		**pH 6.4**	
Taux de phagocytose (%)	Hy	0	53,51 ± 8,06		-		-		-	
		7	53,35 ± 17,61		55,95 ± 11,10		50,52 ± 14,26		56,93 ± 19,73	
		28	62,05 ± 14,07		67 ± 12,92		53,29± 13,47		63,74 ± 9,71	
	Gr	0	34,04 ± 11,13		-		-		-	
		7	39,66 ± 18,98		43,07 ± 15,25		32,94 ± 11,28		40,74 ± 15,93	
		28	45,02 ± 20,56		54,66 ± 18,82		38,41 ± 15,83		52,91 ± 21,09	
Nombre moyen de billes	Hy	0	17,17 ± 5,71	***a***	-	***a***	-		-	***a***
		7	27 ± 19,07	***ab***	27,02 ± 14,31	***ab***	28,45 ± 17,24		30,76 ± 16,02	***ab***
		28	39,67 ± 23,25	***b***	40,34 ± 19,27	***b***	22,75 ± 13,75		24,89 ± 11,49	***b***
	Gr	0	17,86 ± 9,13	***a***	-	***a***	-	***a***	-	***a***
		7	29,11 ± 25,80	***a***	30,21 ± 15,09	***a***	32,99 ± 18,20	***ab***	41,17 ± 15,23	***b***
		28	51,24 ± 24,23	***b***	50,75 ± 20,4	***b***	35,13 ± 18,95	***b***	40,50 ± 22,69	***b***
Activité oxydative (U.A.)	Hy	0	2603,2 ± 2051,9							
		7	1536,7 ± 1714,2		2557,7 ± 1789,9		1389,3 ± 900,2		1976 ± 1706,8	
		28	3652,3 ± 2278,8		2434,0 ± 1995,8		2848,7 ± 1754,1		3519,2 ± 2287	
	Gr	0	657,3 ± 1032,1		-		-		-	
		7	465,4 ± 405,2		237,5 ± 221,6		491,1 ± 671,7		287,2 ± 348,4	
		28	940,3 ± 671,3		831,4 ± 791,5		994,7 ± 864,7		1351,3 ± 777,7	
	BL	0	43,54 ± 71,26		-		-		-	
		7	30,43 ± 30.38		29,76 ± 25,61		37,72 ± 54,38		21,23 ± 23,04	
		28	51,58 ± 36,13		54,08 ± 51,79		90,21 ± 75,93		84,64 ± 34,25	

Tableau 4.5 : *Suite*

Paramètres	Type cellulaire	Temps	Conditions de pH							
			FC (pH 8)		pH 7.5		pH 6.9		pH 6.4	
Contenu en lysosomes (U.A.)	Hy	0	82,6 ± 41,6		-		-		-	***a***
		7	108,3 ± 37,9 **A**		67,3 ± 26,4 **B**		74,5 ± 39,7 **AB**		47,1 ± 20,1 **B**	***b***
		28	84,6 ± 37,1		103,8 ± 39,9		92,6 ± 38,9		65,9 ± 26,5	***ab***
	Gr	0	100,8 ± 59		-		-	***a***	-	
		7	90,8 ± 22,5		67,3 ± 16,7		86,5 ± 35,2	***a***	79,8 ± 24,9	
		28	101,3 ± 33,8 **A**		98,5 ± 30,7 **A**		163,6 ± 55,6 **B**	***b***	97,5 ± 20,6 **A**	
	BL	0	15,87 ± 3,06		-		-		-	
		7	17,60 ± 2,79		18,07 ± 4,87		17,19 ± 3,26		15,07 ± 2,88	
		28	13,83 ± 1,74 **A**		20,05 ± 4,61 **B**		18,55 ± 3,50 **B**		19,26 ± 3,64 **B**	
Activité mitochondriale (U.A.)	Hy	0	27,8 ± 8,9	***a***	-	***a***	-	***a***	-	***a***
		7	46,4 ± 12,6	***b***	49,8 ± 10,8	***b***	55,8 ± 20,1	***b***	52,4 ± 7,1	***b***
		28	63,9 ± 14,7	***c***	96,5 ± 47,6	***c***	78,4 ± 21,8	***c***	67,9 ± 11,4	***c***
	Gr	0	99,2 ± 37,6		-	***a***	-	***a***	-	***a***
		7	127,1 ± 42,9		158,2 ± 33	***b***	130,9 ± 44,8	***b***	148,1 ± 29,9	***ab***
		28	121,5 ± 33,7 **A**		156,2 ± 41,2 **AB**	***b***	283,9 ± 123,8 **C**	***b***	185,3 ± 63,1 **BC**	***b***
	BL	0	19,14 ± 4,57	***a***	-	***a***	-	***a***	-	***a***
		7	36,13 ± 10	***b***	46,99 ± 12,7	***b***	39,31 ± 7,36	***b***	39,62 ± 9,52	***b***
		28	29,19 ± 5,22 **A**	***b***	53,58 ± 29,38 **B**	***b***	50,67 ± 19,77 **B**	***b***	51,45 ± 17,71 **B**	***b***

IV.2.4. Activité mitochondriale

La mesure d'activité mitochondriale indique que ce paramètre augmente dans le temps pour les trois types cellulaires et dans toutes les conditions de pH testées (Tableau 4.5). Pour les hyalinocytes, l'activité mitochondriale augmente de la même façon dans les différentes conditions de pH et aucune différence entre chaque condition n'apparait à T7 ou T28. Pour les granulocytes, cette augmentation d'activité est supérieure pour les moules exposées à un pH de 6.9 et 6.4, ce qui entraine des différences significatives entre les conditions de pH à T28 (ANOVA : $p < 0,001$). Une tendance similaire est observable pour les cellules blast mais cet effet s'applique également pour la condition de pH 7.5 (Tableau 4.5).

IV.3. Sensibilité du mécanisme de phagocytose au cadmium

A l'issue de l'exposition des cellules hémocytaires au cadmium, les calculs de CE_{50} d'inhibition du mécanisme de phagocytose indiquent qu'à T7, aucune différence n'est notable entre les valeurs calculées pour chaque pour les cellules hyalinocytaires (KW : $p = 0,1784$) et granulocytaires (KW $p = 0,0806$) (Figure 4.9 A). A T28, les valeurs calculées pour les granulocytes sont toujours similaires entre les conditions bien que les valeurs mesurées dans les conditions témoins et de pH 7.5 soient inférieures à T28 comparées à celles du T0. Pour les hyalinocytes, la CE_{50} calculée à T28 est significativement plus haute pour la condition de pH la plus acide (Figure 4.9 B).

V. Discussion

Les travaux initiés dans ce chapitre proposent d'étudier au travers des marqueurs hémocytaires, les capacités de la moule zébrée *Dreissena* sp. à faire face à des modifications de température et de pH lors d'exposition *in vivo* pour des périodes de 28 jours. Pendant ces expérimentations en milieu contrôlé, nous avons pu mettre en évidence l'influence de changements de ces facteurs sur les paramètres structuraux et

fonctionnels hémocytaires chez la moule zébrée ainsi que des modulations des effets toxiques exercés par le cadmium sur la fonction de phagocytose des hémocytes.

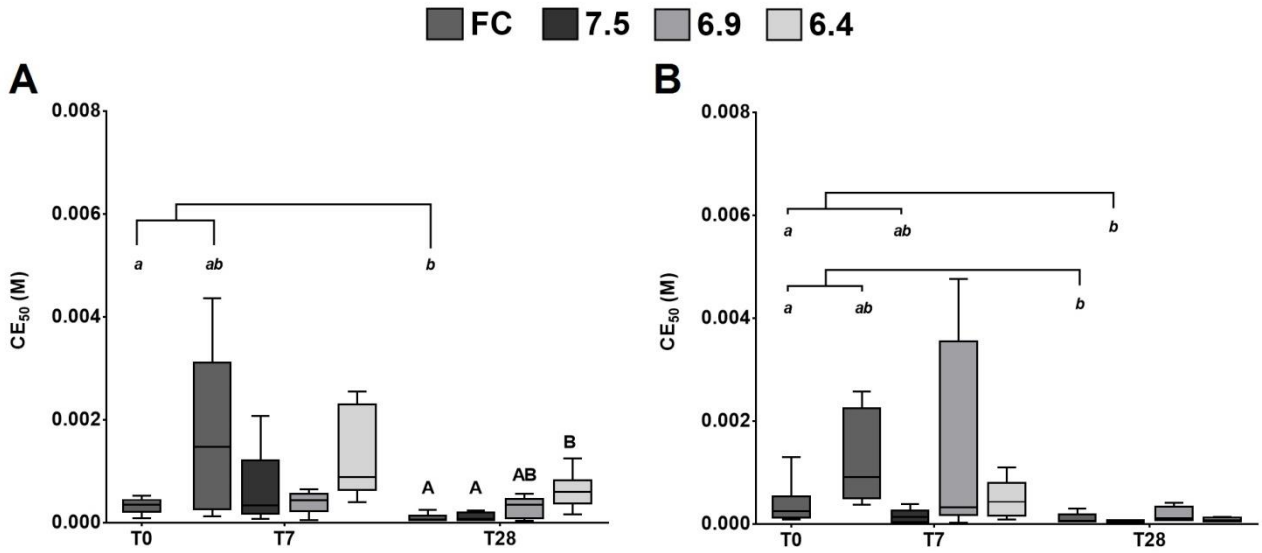


Figure 4. 9 : CE_{50} calculées pour l'activité de phagocytose (A) des hyalinocytes et (B) des granulocytes à l'issue de 21 heures d'exposition au cadmium lors de l'expérimentation de stress de pH. *Les lettres majuscules indiquent les groupes homogènes entre les conditions pour un même temps et les lettres minuscules les groupes homogènes pour une même condition dans le temps.*

IV.1. Effets sur les paramètres structuraux

Les hémocytes sont les premiers médiateurs cellulaires de la réponse immunitaire chez les bivalves. De ce fait, la concentration en hémocytes circulant est un indicateur général du statut immunitaire des individus dont les changements peuvent indiquer un stress (Auffret, 2005). Bien que notre étude ne fasse pas part de modulation de concentration en cellules circulantes suite au stress thermique, plusieurs études font état de l'influence de la température sur la concentration hémocytaire chez les mollusques. Ainsi, il a été observé que ce facteur pouvait entraîner aussi bien une augmentation (Chu *et al.*, 1993 ; Paillard *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2007 ; Monari *et al.*,

2007 ; Yu *et al.*, 2009 ; Perrigault *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2015) qu'une diminution de la concentration hémocytaire chez les bivalves (Malham *et al.*, 2009 ; Mackenzie *et al.*, 2014). Pour le pH, nos résultats indiquent une augmentation de la concentration hémocytaire pour les pH les plus faibles lors du dernier point de prélèvement. Les effets observés dans la littérature varient selon l'espèce étudiée et l'étude considérée. Chez *Mytilus edulis*, *Crassostrea virginica* et *Mercenaria mercenaria*, l'acidification de l'eau n'entraine pas de modulation de la concentration hémocytaire (Bibby *et al.*, 2008 ; Mackenzy et al., 2014) alors que dans le cas de *Mytilus galloprovincialis* et *Chamelea gallina*, une diminution du pH peut entrainer une diminution ou une augmentation de la concentration hémocytaire selon les conditions de salinité (Matozzo *et al.*, 2012). Chez *Pinctada fucata*, l'acidification de l'eau est associée à des concentrations hémocytaires plus fortes (Li *et al.*, 2015). Les augmentations de concentrations hémocytaires peuvent être expliquées par une prolifération cellulaire plus forte ou une mobilisation des cellules depuis les tissus vers l'hémolymphe alors que les diminutions de concentration peuvent résulter d'une augmentation de lyse cellulaire ou une augmentation de l'infiltration tissulaire (Pipe & Coles 1995). Dans le cas de nos études, on note une concentration hémocytaire significativement inférieure dans les témoins à T0 de l'expérimentation de stress de pH comparativement au stress thermique (T-test : $p < 0,001$). Si l'on compare les conditions témoins à T0, le profil de distribution hémocytaire et la viabilité sont semblables entre les deux expérimentations (Distribution : T-test : Hy : $p = 0,679$; Gr : $p = 0,086$; BL : $p = 0,340$; Viabilité : T-test : $p = 0,061$) ce qui suggère que cette différence est liée à l'infiltration des hémocytes plutôt qu'à leur lyse. Lors du stress de pH, on observe que l'augmentation de concentration cellulaire à T28 dans les conditions les plus acides est associée à un taux de cellules blast-like plus élevé. De par leur rôle supposé de cellules précurseur (Hine *et al.*, 1999; Matozzo *et al.*, 2008), l'augmentation de la concentration hémocytaire pourrait être associée à une prolifération accrue, ce qui expliquerait l'observation de cellules indifférenciées en plus forte proportion.

Certaines études font part d'effets de la température lors d'exposition *in vivo* sur la viabilité hémocytaire. Ainsi, chez *Crassostrea virginica*, la viabilité hémocytaire est affectée à la température de 28°C comparé à des individus placés à 20°C mais ces effets ne sont pas marqués lors d'une seconde expérimentation réalisée par le même

auteur (Hégaret *et al.*, 2003 ; 2004). Selon nos résultats, la baisse de température de 20°C à 4°C induit une augmentation significative de mortalité hémocytaire comparé aux autres conditions. En parallèle de cet effet, nous observons une diminution de la proportion de hyalinocytes et granulocytes au profit de l'augmentation du taux de blast-like. L'absence de différence à T28 suggère que la nécrose cellulaire induite à T7 est compensée par une prolifération hémocytaire accrue suivi d'une différenciation cellulaire permettant de rétablir la distribution cellulaire initiale.

Chez *M. californianus* et *M. galloprovincialis*, il a été démontré qu'un stress par augmentation ou diminution de la température induisait une perte de viabilité hémocytaire associée à des dommages à l'ADN (Yao *et al.*, 2012). Les effets observés sur la viabilité sont en accord avec nos observations à 4°C mais d'autres expérimentations seraient nécessaires afin de déterminer si ces effets sont associés à une réduction d'intégrité de l'ADN par la réalisation de test des comètes par exemple.

V.2. Effets sur les paramètres fonctionnels

V.2.1 Effets sur la phagocytose

La phagocytose constitue le principal mécanisme de défense contre les pathogènes mais ce mécanisme est également d'une importance majeure dans la physiologie des mollusques pour son rôle dans les phénomènes de remaniements tissulaires, etc. Lors de nos expérimentations, ce mécanisme s'avère n'avoir été que très peu affecté par les différentes conditions de température et de pH. Le seul effet notable apparait lors du stress thermique à T7, 4°C pour lequel le nombre moyen de billes phagocytées est inférieur. Cependant il correspond à la condition pour laquelle la viabilité hémocytaire est affectée ce qui justifie la moindre performance des cellules pour réaliser la phagocytose. Dans la littérature, plusieurs références font état d'une augmentation de la phagocytose chez les mollusques avec l'augmentation de la température *in vivo,* jusqu'à un certain point à partir duquel la température entraine une diminution de cette activité (Chu & La Peyre 1993 ; Hégaret *et al.*, 2003 ; Monari *et al.*, 2007 ; Malham *et al.*, 2009 ;

Perrigault *et al.*, 2011 ; Mackenzie *et al.*, 2014). Ceci suggère qu'au-delà ou en dessous d'un certain seuil, pouvant différer selon l'espèce, la température peut constituer un facteur de stress pour les hémocytes. Concernant les effets du pH, des études font état d'une réduction de l'activité de phagocytose et de l'action cytotoxique des hémocytes lors d'une acidification du milieu (Malagoli *et al.*, 2005 ; Bibby *et al.*, 2009). Les auteurs avancent comme hypothèse que l'acidification du milieu engendre une dissolution plus importante de la coquille des moules, résultant en une élévation des niveaux de calcium dans l'hémolymphe. Cette plus forte concentration en calcium pourrait affecter le métabolisme cellulaire en perturbant la signalisation intracellulaire dépendantes du calcium et aboutir à une modulation des fonctions cellulaires d'adhésion ou de phagocytose (Gazeau *et al.*, 2007 ; Bibby *et al.*, 2008 ; Matozzo *et al.*, 2011). Cette hypothèse est appuyée par les récents travaux de Li *et al.*, 2015 qui ont mis en évidence un plus fort taux de calcium dans l'hémolymphe d'huîtres perlières *Pinctada fucata* ayant subis une acidification du milieu de maintien. Dans notre étude, l'absence de modulation du mécanisme de phagocytose dans le cas d'une acidification ne permet pas d'appuyer ces hypothèses. Ceci peut possiblement être lié à une plus forte tolérance de l'espèce à l'augmentation du calcium dans le milieu. En effet, il a été décrit que la moule zébrée était absente des écosystèmes dont l'eau présente une faible concentration calcique (Neary & Leach, 1991 ; Sprung 1993). Nos résultats indiquent que la dreissène est capable de maintenir l'activité phagocytaire des hémocytes sur une large gamme de conditions environnementales, pour des températures comprises entre 4°C et 25°C et pour un pH compris entre 6.4 à 8, ce qui lui permet de maintenir ses défenses immunitaires aussi bien en saison chaude qu'en saison froide.

V.2.2. Effets sur l'activité oxydative

A l'issue de la phagocytose, l'activité oxydative des hémocytes permet l'élimination des pathogènes. Les résultats obtenus lors de nos expérimentations indiquent que l'acidification de l'eau n'induit pas de modulation de cette fonction ce qui est similaire aux résultats obtenus par Bibby *et al.*, 2008 chez la moule bleue *Mytilus edulis*. Bien que la variabilité de réponses mesurée pour ce marqueur soit importante, les données

obtenues à l'issue du stress thermique indiquent que l'activité oxydative des hémocytes est plus forte à 4 et 15°C. Ces observations vont dans le sens des travaux de Perrigault *et al.*, 2011 qui observent une activité oxydative hémocytaire plus forte chez la palourde *Mercenaria mercenaria,* après 2 et 4 mois d'exposition à la température de 13°C comparé aux températures de 21 et 27°C. Il est possible qu'aux faibles températures, la concentration en oxygène dissous soit plus forte ce qui expose les individus à un stress oxydant plus important (Camus *et al.*, 2000). Cependant, des effets opposés ont également été observés dans d'autres données de la littérature, révélant généralement une activité oxydative cellulaire plus faible aux basses températures (Abele *et al.*, 2002 ; Hégaret *et al.*, 2003 ; Cheng *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2007 ; Mackenzie *et al.*, 2014). Les effets observés dans notre étude pourraient signaler un stress oxydant plus important des cellules lié à une perturbation des régulations par le système antioxydant, par exemple de l'activité SOD qui s'avère être modulée par la température (Chen *et al.*, 2007 ; Monari *et al.*, 2007).

V.2.3. Effets sur le système lysosomal

Les lysosomes jouent un rôle clef dans les défenses à médiation cellulaire en permettant la séquestration de pathogènes et d'enzymes hydrolytiques impliquées dans la dégradation intracellulaire. L'étude du système lysosomale hémocytaire lors de notre expérience indique que dans le cas du stress de température pour la condition témoin, on observe une augmentation dans le temps du contenu en lysosomes. Dans les autres conditions thermiques, on observe dans l'ensemble, une diminution transitoire du contenu en lysosomes que ce soit pour l'augmentation ou la diminution de température. Des effets transitoires similaires sont observables chez les hyalinocytes dans le cas de l'effet de l'acidification. Ces résultats suggèrent que les deux types de stress testés peuvent entraîner une réduction du nombre de lysosomes cellulaires ou une déstabilisation des membranes lysosomales, empêchant le maintien d'un pH intralysosomal bas, ce qui va influencer l'accumulation de la sonde fluorescente utilisée (Lysotracker). Ce phénomène peut être lié aux remaniements de lipides membranaires induits par les changements de température et qui vont influencer la fluidité

membranaire (Pernet *et al.*, 2007). Il faut souligner que la population de dreissène utilisée est issue d'un site subissant d'importantes gelées hivernales auxquelles ces moules survivent. L'effet transitoire observé dans notre étude peut donc s'apparenter à une acclimatation des individus à ces nouvelles conditions auxquelles elles peuvent être confrontées en hiver. Plusieurs travaux utilisant le test de rétention du rouge neutre ont étudié les effets de la température sur la stabilité des membranes lysosomales et obtiennent des résultats allant dans le sens de notre étude. Ainsi, les données de la littérature font état d'une diminution de la stabilité des membranes à la fois suite à l'exposition des organismes à des températures faibles comme à des fortes températures, ce qui peut s'apparenter à un stress cellulaire (Hauton *et al.*, 1998 ; Camus *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 2009 ; Yao *et al.*, 2012). Les travaux de Zhang *et al.*, 2006 réalisés chez *C. gigas*, indiquent que la réduction de stabilité membranaire des lysosomes suite à une augmentation ou une diminution de température est un processus réversible. Par conséquent, après avoir subi un premier stress, lorsque les individus sont replacés à la température d'acclimatation, les auteurs observent un regain progressif de stabilité des membranes lysosomales hémocytaires. Pour les effets du pH, des conséquences similaires sur la stabilité des membranes lysosomales ont été observées dans le cas d'une acidification de l'eau (Bibby *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2015).

V.2.4. Effets sur l'activité mitochondriale

Lors des deux expérimentations, des effets variés sur l'activité mitochondriale ont été induits par les changements de température ou de pH. Ainsi pour la température, des réponses différentes ont été observées selon le type cellulaire considéré pour les températures de 15°C et 4°C. Une diminution de l'activité mitochondriale des hémocytes d'organismes exposés à de plus faibles températures peut s'expliquer par une diminution du métabolisme de base des individus de façon concomitante à la diminution de température en lien avec la baisse possible des activités enzymatiques associées (Abele *et al.*, 2002 ; Lannig *et al.*, 2006). C'est le cas des résultats obtenus pour l'activité mitochondriale des hyalinocytes. Cependant, pour les granulocytes, l'augmentation de

cette activité à 4°C peut traduire un phénomène différent. Pour cette condition et ce type cellulaire, on observe en parallèle une augmentation de leur activité oxydative. Les hausses de ces activités à basse température peuvent être là encore possiblement liées à la baisse d'activités des enzymes anti-oxydantes et conduire à une dérégulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Abele *et al.*, 2002).

Dans le cas du stress de pH, l'augmentation d'activité mitochondriale observée peut traduire une augmentation du métabolisme cellulaire afin de réguler les demandes en énergie engendrées par les nouvelles conditions, afin d'assurer les fonctions cellulaires telles que la phagocytose ou l'activité oxydative qui s'avèrent ne pas être affectées. Cette hypothèse ne va pas dans le sens des résultats publiés par Ivanina & Sokolova 2013 qui n'observent pas d'effet du pH sur la respiration et le potentiel membranaire mitochondrial chez *Mercenaria mercenaria* et *Crassostrea virginica*. Cependant, la différence de tolérance de pH entre ces espèces peut influencer les réponses observées.

Les arguments avancés précédemment concernant l'augmentation du taux de calcium hémolymphatique engendré par la dissolution plus importante de la coquille en milieu acide, pourrait perturber certaines voies de signalisation intracellulaires dépendantes du calcium et aboutir à une modulation de l'activité mitochondriale (Gazeau *et al.*, 2007 ; Bibby *et al.*, 2008 ; Matozzo *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2015). Cette hypothèse pourrait expliquer l'augmentation de l'activité mitochondriale observée chez la dreissène pour les conditions de pH inférieures au contrôle. Chez *Pinctada fucata*, il a été observé que l'acidification du milieu entraînait également une acidification de l'hémolymphe (Li *et al.*, 2015). Ces changements de composition ionique du milieu extracellulaire peuvent potentiellement être responsables de perturbations du gradient de protons et moduler les activités mitochondriales. De plus, une étude réalisée chez la dreissène indique que des changements de pH (< 7.0) ont pour conséquence de perturber les flux ioniques et notamment ceux liés au calcium entre l'animal et le milieu. Cet effet est cependant transitoire et l'équilibre est rétabli après quelques jours ce qui va dans le sens de nos observations (Vinogradov *et al.*, 1993).

V.3. Effets de la température et du pH sur la sensibilité au cadmium

Les expérimentations de type « stress on stress » sont utilisées chez les bivalves et la plus connue consiste en l'évaluation du temps de survie des individus hors de l'eau après avoir subi un premier stress (Viarengo *et al.*, 1995 ; de Zwaan *et al.*, 1996). Dans le cas de la palourde *Chamelea gallina*, une augmentation de la température induit une réduction du temps de survie hors de l'eau (Monari *et al.*, 2007). Plusieurs autres études font état d'interactions entre les paramètres physico-chimiques de l'eau et l'effet des polluants. Ainsi, Ivanina *et al.*, (2014), indiquent que la diminution du pH par augmentation du CO_2 dissous est responsable d'une augmentation des effets néfastes engendrés par le cadmium ou le cuivre chez *Crassostrea virginica* et *Mercenaria mercenaria*. Toujours chez *C. virginica*, il a été observé que le cadmium associé à une température de 28°C engendrait une augmentation de mortalité des huîtres comparé à celles exposées à 20°C. De plus, une réduction de la production d'ATP cellulaire est notable chez les individus exposés au cadmium à 28°C alors qu'aucun effet n'est observé lorsque les effets de la température ou du cadmium sont testés séparément (Lannig *et al.*, 2006a ; 2006b). Chez *Mya arenaria*, une augmentation de la température entraîne une diminution de la capacité à répondre à une contamination par des pesticides (Grecco *et al.*, 2011).

Concernant les effets sur les cellules hémocytaires dans le cas de notre étude, on observe une augmentation de la sensibilité au cadmium du mécanisme de phagocytose chez les moules ayant subi une augmentation de température de 5°C. Dans le cas du stress de pH, un effet protecteur sur le mécanisme de phagocytose apparaît suite à l'exposition au cadmium des hémocytes prélevés chez les organismes exposé aux plus faibles valeurs de pH. Chez *Crassostrea virginica*, il a été démontré qu'une augmentation de la température entrainait une augmentation de la toxicité du cadmium sur les fonctions respiratoires mitochondriales (Sokolova 2004). Chez cette même espèce ainsi que la palourde *Mercenaria mercenaria*, l'acidification de l'eau avait un effet protecteur contre les effets néfastes du cadmium sur l'activité mitochondriale mais le mécanisme induisant cette réponse reste indéterminé (Ivanina & Sokolova 2013). Ces résultats vont dans le sens des effets observés dans notre étude à l'issue des 28 jours

d'exposition aux différentes conditions thermiques et de pH. Les effets observés sur les réponses basales hémocytaires de notre étude indiquent globalement que les effets observés à T7 ne sont plus présents à T28 ce qui suggère une acclimatation des moules à ces nouvelles conditions thermiques. Cette acclimatation ou compensation est un processus consommateur d'énergie qui peut entraîner un transfert d'énergie depuis une fonction physiologique au dépend d'une autre (Sokolova *et al.*, 2012 ; Gazeau *et al.*, 2013). Ainsi, le maintien des fonctions hémocytaires se ferait au détriment d'une mise en place efficace d'activités de détoxication des cellules, ce qui pourrait expliquer la sensibilité accrue des cellules hémocytaires au cadmium dans le cas du stress thermique. Les données obtenues sur d'autres fonctions physiologiques (reproduction, système anti-oxydant) par les laboratoires partenaires impliqués dans ces expérimentations pour le projet IPOC pourront apporter des informations complémentaires afin de vérifier cette hypothèse.

Un phénomène similaire a été observé chez la dreissène dans une étude qui s'est intéressée aux dommages à l'ADN générés par un stress de température (Buschini *et al.*, 2003). Des animaux acclimatés à 20°C pendant deux semaines subissent un changement de températures, sur une période de 15 heures, pour atteindre des conditions comprises entre 4°C et 37°C. Les résultats de ces travaux mettent en évidence que des températures plus élevées sont associées à une sensibilité plus importante des hémocytes à un composé génotoxique de référence ce qui rejoint nos observations concernant la plus forte sensibilité au cadmium des hémocytes exposés à la température de 25°C comparé aux températures de 15°C et 4°C.

V.4. Tolérances et limites face aux changements environnementaux chez la dreissène

Plusieurs travaux ont été réalisés dans l'objectif d'améliorer le contrôle de l'invasion de cette espèce afin de limiter ses effets néfastes sur les stations de production d'énergie. Elles consistaient en la mise en place de stratégies de traitement thermique afin de réduire l'impact de cette espèce sans utiliser de produits chimiques. Des travaux réalisés sur des populations de dreissènes européennes et nord-américaines ont étudié

la tolérance thermique des bivalves lors d'expériences de stress de température aigus. Jenner & Janssen-Mommen (1992) ont observé chez des populations de moules originaires des Pays-Bas une tolérance inférieure à 2 heures à la température de 33°C pour des moules acclimatées à température ambiante. Ceci indique que la température d'acclimatation des individus est un facteur qui va influencer directement la tolérance des moules à la température (Heugens *et al.*, 2001). Pour des moules issues de populations nord-américaines, le temps de survie des individus est de moins d'une heure à 36°C quelle que soit la température d'acclimatation alors qu'à la température de 33°C, la durée de survie diffère de plusieurs jours selon l'étude considérée (Iwanyzki & McCauley 1992 ; McMahon *et al.*, 1995). Ces études soulignent le fait que les moules issues de populations nord-américaines possèdent une tolérance thermique supérieure à celle des populations européennes et que les effets de la température, dans le cadre de changements climatiques, pourront potentiellement avoir des impacts différents selon la génétique des populations considérées. Outre l'influence de la génétique, il a été montré chez la dreissène que le statut reproducteur influençait la tolérance à la température des individus qui exprimaient une sensibilité plus importante lors de la période de reproduction (Rajagopal *et al.*, 2014). Ce phénomène a également été observé chez *Chamelea gallina* dont la sensibilité à la température était plus faible en dehors de la période de reproduction (Monari *et al.*, 2007). Récemment, une étude a démontré que chez *Mytilus edulis,* l'augmentation de température et l'acidification de l'eau affectaient plus grandement le métabolisme des mâles que des femelles (Ellis *et al.*, 2014). De par ces observations, nous pouvons supposer que les effets observés lors de nos expérimentations pourraient être plus marqués chez des populations européennes de dreissènes ou lors d'expérimentations réalisées en période de ponte. Il faut également noter que lors d'un prélèvement réalisé à Pointe-des-Cascades en août 2014, la température de l'eau mesurée était de 28°C pour un pH de 8.9. Dans un contexte de changement climatique, une augmentation de la température de quelques degrés durant la période de reproduction des dreissènes pourrait générer des conditions thermiques létales pour ces populations contrairement aux changements de pH qui resteraient dans la gamme de tolérance de l'espèce. Ces hypothèses vont dans le sens des résultats obtenus par Mackenzie *et al.*, (2014) qui indiquent que chez *Mytilus edulis*,

la température va plus fortement affecter les réponses immunitaires que le pH ce qui est en adéquation avec nos résultats qui indiquent que des changements de pH vont avoir des effets moins marqués et sur un nombre de paramètres inférieur comparé aux résultats obtenus lors du stress thermique. Une étude menée chez l'huître *Saccostrea glomerata* indique qu'une acidification du milieu pendant 48 heures n'entraîne pas de modulation significative de l'expression de gènes normalement associés à la réponse immunitaire. Les auteurs suggèrent que l'acidification ne constitue pas un facteur majeur pouvant menacer l'immunosurveillance des huîtres comparativement aux changements de salinités (Green & Barnes 2010).

Cependant, d'un point de vue expérimental, on observe principalement deux méthodologies dans la littérature visant à étudier les effets de l'acidification du milieu. La première consiste en l'ajout d'acide dans le milieu pour réduire le pH comme dans notre expérimentation alors que la seconde méthodologie consiste en l'augmentation de la concentration en CO_2 dans l'eau (hypercapnie) générant un excès de protons qui va entrainer une baisse du pH (Raven *et al.*, 2005). Du fait de ces deux modalités, nous ne pouvons pas exclure que les effets physiologiques générés par ces deux méthodes puissent varier.

VI. Conclusions

Les résultats obtenus lors de ces expérimentations font ressortir plusieurs points importants. Le premier est que les dreissènes peuvent supporter une large gamme de température et de pH. En effet, bien qu'à court terme certains marqueurs hémocytaires s'avèrent être modulés par les changements de température ou de pH, ils sont généralement atténués dans le temps du fait de la capacité des individus à s'adapter à des conditions environnementales fluctuantes en maintenant leurs activités hémocytaires. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'énergie allouée au maintien de ces fonctions puisse potentiellement se faire au détriment d'autres fonctions physiologiques et affecter une autre composante physiologique de l'espèce comme la reproduction par exemple. Ceci nous permet de supposer que les paramètres physico-chimiques du milieu ne devraient pas constituer un facteur confondant majeur pour

l'utilisation de ces marqueurs hémocytaires lors d'expérimentation *in situ*. Cela constitue un atout supplémentaire pour l'utilisation de ce mollusque en biosurveillance des milieux aquatiques. Cependant, cet atout peu constituer une contrainte, car le genre *Dreissena* pourrait ainsi s'avérer peu sensible aux stress environnementaux.

Bien que la moule zébrée semble compenser les effets générés par les changements de température ou de pH et réussit à maintenir ses niveaux d'activités hémocytaires, nos résultats indiquent que ces facteurs environnementaux peuvent influencer sa physiologie de façon à moduler sa sensibilité suite à l'exposition à un stress supplémentaire. De plus, d'après les données de la littérature, nous pouvons supposer que ces effets pourraient être amplifiés en fonction de plusieurs paramètres comme la génétique de la population ou son statut reproducteur. La période de ponte étant caractérisée par des niveaux d'activités hémocytaires réduits et des réserves énergétiques basses (Article n°1), nous pouvons supposer que cette période puisse constituer un point critique de sensibilité aux fluctuations environnementales.

Pour finir, les effets observés lors de nos travaux ont été étudiés en exerçant des stress agissant indépendamment sur les moules. L'interaction entre les changements de température et l'acidification du milieu pourrait générer des conditions de stress plus importantes que ce que nous avons pu observer en milieu contrôlé. Dans le milieu naturel, la présence de contaminants associée à un environnement fluctuant ajoute un degré de complexité pour expliquer les effets interactifs de ces paramètres (Laskowski *et al.*, 2010). Bien que nous ayons observé que les effets de la température ou du pH influençaient la tolérance des dreissènes aux contaminants, des travaux complémentaires seraient nécessaires afin d'étudier les effets de la contamination sur la réduction de tolérance à la température des individus (Lannig *et al.*, 2006b ; Holmstrup *et al.*, 2010).

Chapitre 5: Approches *in situ* sur une large échelle spatiale

La phase de caractérisation des marqueurs liés à la physiologie de la dreissène a permis de mieux cerner leurs réponses en laboratoire (i) dans un contexte *ex vivo* d'exposition des hémocytes à un stress métallique et (ii) dans un contexte *in vivo* d'exposition des dreissènes à des stress thermiques d'une part et à des stress de pH d'autre part. Il s'agit à partir de là, d'analyser les réponses des biomarqueurs hémocytaires chez des moules zébrées dans des contextes de terrain (approche *in situ*), directement en milieux naturels.

Les études *in situ* permettent la réalisation de mesures de bioaccumulation des contaminants ou de réponses biologiques dans des conditions environnementales réalistes. Ces analyses permettent l'exposition des organismes *via* différentes voies et contribuent à améliorer la compréhension des liens entre les mécanismes d'accumulation de contaminants et les réponses biologiques des individus. L'utilisation de bivalves en surveillance environnementale permet d'appréhender la biodisponibilité des contaminants présents dans les écosystèmes aquatiques. A ce titre, la moule zébrée constitue une espèce sentinelle de qualité du fait de ses caractéristiques biologiques (voir chapitre 1, contexte bibliographique). Cependant, de nombreux facteurs liés aux conditions environnementales mais également endogènes peuvent moduler les processus de bioaccumulation des contaminants et/ou entraîner une variabilité des réponses biologiques chez l'espèce d'intérêt. Les réponses des marqueurs biologiques mesurés sur le terrain vont donc résulter des interactions complexes entre ces paramètres intrinsèques et extrinsèques.

Ce chapitre de la thèse traite des modulations de la structure et des activités hémocytaires chez des populations de dreissènes respectivement natives des bassins de la Seine et du Saint-Laurent dans un contexte de biosurveillance de la qualité des masses d'eau douce ciblées. Ces expérimentations ont été menées afin d'obtenir des données de variations des biomarqueurs hémocytaires sur des populations sauvages en milieux naturels pour mieux appréhender les effets multi-stress auquel ces populations de dreissénidés sont exposées.

Deux approches distinctes ont été réalisées. La première a consisté en l'observation temporelle des réponses des biomarqueurs hémocytaires chez des moules vivant sur un

site chroniquement contaminé (Oise, France) par des métaux. La seconde approche a concerné l'observation des paramètres hémocytaires de populations naturelles de dreissènes sur des stations situées le long d'un gradient de contamination sur le fleuve Saint-Laurent (Canada) ce qui permet d'analyser, pour une même masse d'eau différentiellement contaminée, les types de réponses hémocytaires observées, dans un contexte de stress multiples. Lors des échantillonnages sur le terrain, la présence de deux espèces proches de dreissènidés (*Dreissena polymorpha* et *Dreissena bugensis rostriformis*) a été observée sur les sites tant en France qu'au Canada. La dernière partie de ce travail a donc consisté en l'évaluation des marqueurs hémocytaires chez ces deux espèces vivant en sympatrie pour déterminer si le facteur espèce constitue un facteur de confusion important pour l'usage des marqueurs hémocytaires dans un contexte de biosurveillance écotoxicologique.

Partie 1 : Variations temporelles et spatiales des réponses hémocytaires chez des populations de moules zébrées issues de sites différentiellement contaminés

I. Introduction

L'objectif de la première étude de terrain présentée consiste à étudier la variabilité temporelle des réponses des marqueurs hémocytaires d'une population naturelle établie sur un site du bassin de la Seine chroniquement contaminé par des métaux. Les données recueillies devraient permettre d'apporter des informations supplémentaires sur les réponses de la boîte à outils des biomarqueurs hémocytaires, dans un contexte de changements saisonniers du statut physiologique des individus subissant parallèlement une pression de contamination métallique dans le milieu naturel. Le site sélectionné pour cette étude est situé dans le bassin versant de la Seine. Ce système hydrographique représente 23 000 km de cours d'eau répartis entre la Seine et ses principaux affluents (Aube, Marne, Yonne, Oise et Eure) (Figure 5.1). Ce territoire regroupe une population de plus de 17 millions d'habitants parmi lesquels 10 millions sont concentrés sur la ville de Paris. Cette importante urbanisation est associée à de nombreuses activités industrielles (notamment pétrochimiques) et agricoles. Ces activités vont constituer des sources importantes de rejets de substances potentiellement dangereuses pour les écosystèmes et qui pourront être véhiculées dans ce vaste système hydrographique jusqu'à l'estuaire de la baie de Seine. La contamination de l'hydrosystème Seine est suivie depuis plusieurs années au travers de différents programmes de recherche (Piren-Seine, GIP Seine-Aval) et de programmes de suivi de la qualité des masses d'eau, en application de la Directive Cadre sur l'Eau.

Initialement, le site d'étude aurait dû se situer sur la Seine, en aval de l'agglomération parisienne. Cependant, étant dans l'impossibilité de prélever des dreissènes de par leur absence sur de nombreux sites prospectés sur la Seine, le suivi a été réalisé sur une population établie sur l'Oise. La station de prélèvement des dreissènes est positionnée dans un secteur de l'Oise, affluent de la Seine, à forte densité humaine et aux activités

industrielles intenses. Lors de cette étude, nous avons procédé à quatre échantillonnages correspondants pour les moules à quatre périodes physiologiquement distinctes de leur cycle de reproduction afin d'observer la variabilité des biomarqueurs hémocytaires en lien avec l'évolution de la contamination métallique du site sélectionné.

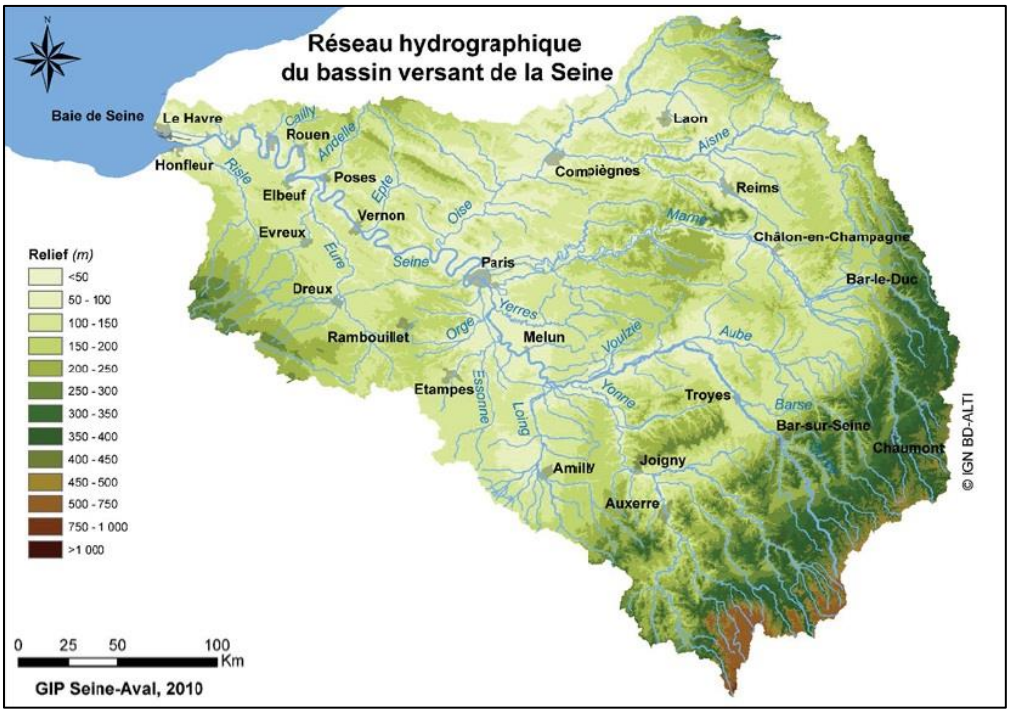


Figure 5. 1 : Réseau hydrographique du bassin versant de la Seine. *Tiré du rapport GIP Seine-Aval 2010*.

La seconde étude *in situ* a été réalisée au Canada et avait pour objectif d'étudier pour une saison donnée, les biomarqueurs hémocytaires chez des populations naturelles de moules zébrées prélevées sur des sites présentant différents degrés de contaminations chimiques.

Le système hydrographique du Saint-Laurent, incluant les Grands Lacs, s'étend sur environ 1600 kilomètres et constitue le troisième système le plus important en Amérique du Nord après ceux du Mississippi et du Mackenzie. Avec un bassin versant d'une superficie de plus d'1,6 millions de kilomètres carrés, il draine plus de 25% des réserves mondiales en eau douce (Environnement Canada 2015). Le Saint-Laurent reçoit les eaux de 244 affluents ce qui en fait un écosystème complexe dont les propriétés

physico-chimiques changent d'amont en aval. Le fleuve est classiquement divisé en quatre régions hydrographiques (Figure 5.2) :

- Le tronçon fluvial : composé d'eau douce, il regroupe les trois lacs fluviaux : Saint-François, Saint-Louis et Saint-Pierre. Ces étendues possèdent la taille d'un lac mais leur hydrodynamisme est typique d'un fleuve et constituent une zone importante de sédimentation (Carignan & Lorrain 2000).
- L'estuaire, faisant le lien entre le fleuve et le golfe
    - Estuaire fluvial : Il débute près de Trois-Rivières et se termine dans la région de Québec, il est composé d'eau douce provenant des Grands Lacs
    - Estuaire moyen : composé d'eaux saumâtres il constitue le lieu de rencontre entre les eaux douces du fleuve et les eaux salées du golfe
- L'estuaire maritime et le golfe : débutant à Tadoussac, il est composé d'eau salée chargée en nutriments en provenance de l'Atlantique.

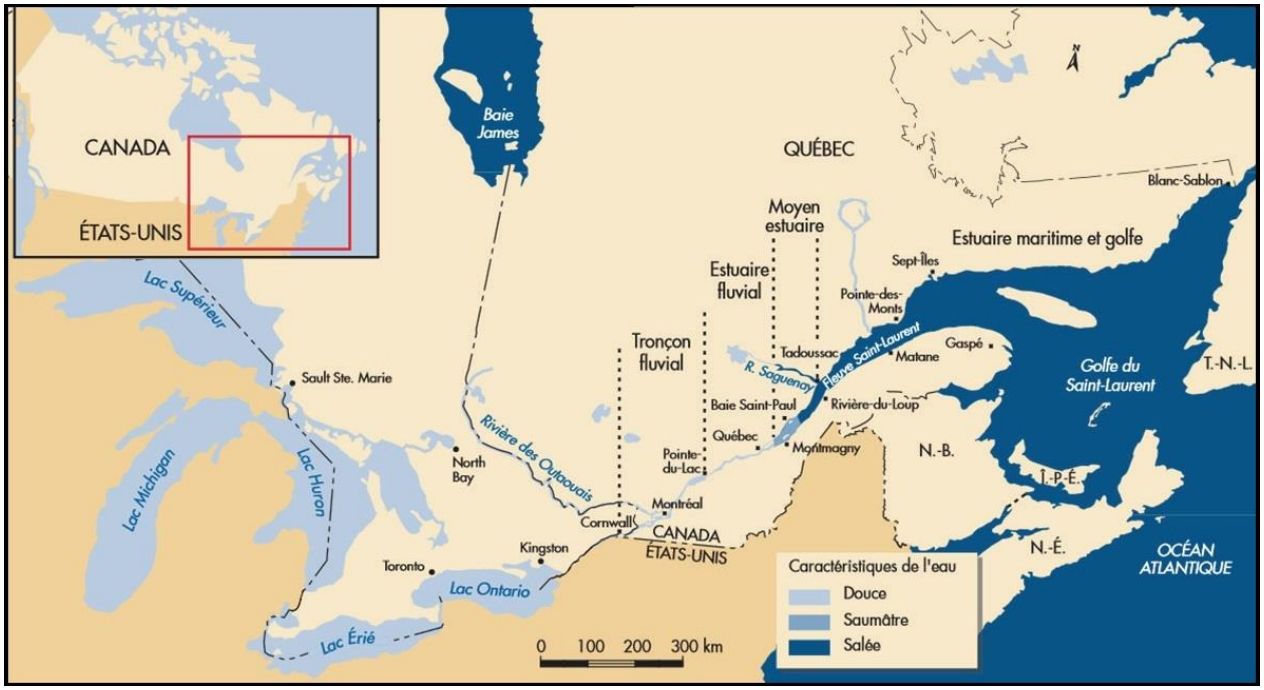


Figure 5. 2 : Réseau hydrographique du Saint-Laurent (Groupe de travail Suivi de l'état du Saint-Laurent, 2014).

Outre la fragmentation que l'écosystème subit, le Saint-Laurent est soumis depuis longtemps à de nombreuses sources de contaminations liées à l'urbanisation, aux activités industrielles et agricoles présentes sur son bassin versant qui contribuent à la dégradation de l'écosystème. Le suivi de l'état du Saint-Laurent est assuré par des organismes gouvernementaux Canadiens et Québécois et implique de nombreux acteurs qui interviennent dans l'analyse de qualité de nombreuses composantes physico-chimiques et biologiques.

Les moules zébrées sont présentes dans l'écosystème du Saint-Laurent avec une aire de répartition comprise de la région des Grands Lacs où elles ont été détectées pour la première fois en 1988 (Hébert *et al.*, 1989) jusqu'à l'île d'Orléans en aval de Québec où elles atteignent leurs limites de tolérance de salinité (Mellina & Rasmussen 1994). De par sa répartition tout le long de la partie fluviale et de ses caractéristiques biologiques, les populations naturelles de dreissénidés du Saint-Laurent ont fait l'objet d'études en écotoxicologie ayant notamment permis de mettre en évidence la présence de pollutions métalliques et organométalliques dans les eaux de ce bassin (Regoli *et al.*, 1999 ; 2001 Kwan *et al.*, 2003; Johns *et al.*, 2011). Quelques travaux ont utilisé des biomarqueurs chez la moule zébrée pour révéler des perturbations générées par la présence de contaminations chimiques (de Lafontaine *et al.*, 2000 ; Gagné *et al.*, 2002).

II. Matériels et Méthodes

II.1. Site d'étude en France

Le site de prélèvement des moules est localisé à Verneuil en Halatte (49°16'49.4"N ; 2°30'35.7"E) sur la rivière Oise (Figure 5.3). Les moules (Longueur : 23,1 ± 1,30 mm, poids : 1,722 ± 0,285 g) ont été prélevées en septembre 2014 (période de repos sexuel), décembre 2014 (début de gamétogenèse), mars 2015 (en gamétogenèse) et juin 2015 (pré-ponte) (Palais *et al.*, 2011 ; Knigge *et al.*, 2014). Les paramètres physico-chimiques de l'eau mesurés aux différents temps sont regroupés dans le tableau 5.1. Pour chaque échantillonnage, des moules ont été réservées pour réaliser les analyses des concentrations en métaux bio-accumulés ainsi que l'analyse des biomarqueurs

hémocytaires par cytométrie de flux. A l'issue des prélèvements, les moules collectées ont été maintenues au laboratoire pendant 24 heures dans l'eau de leur site à température du site avant d'être utilisées pour les expérimentations pour éviter de mesurer un stress engendré par le transport des individus.

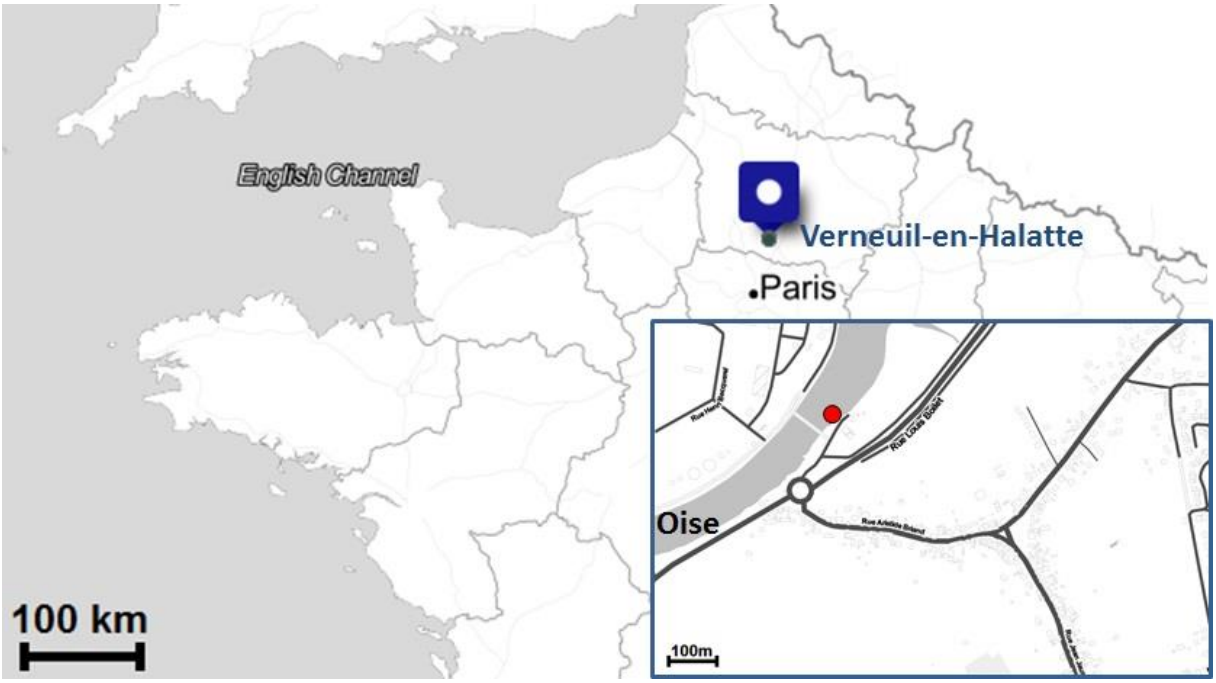


Figure 5. 3 : Localisation du site d'échantillonnage des moules zébrées sur la rivière Oise.

Tableau 5. 1 : Paramètres physico-chimiques relevés sur le site français de la rivière Oise lors des prélèvements.

Prélèvement	Température	pH	Conductivité
Septembre 2014	18,6 °C	8.10	684 µS.cm^{-1}
Décembre 2014	6,2 °C	8.57	364 µS.cm^{-1}
Mars 2015	8,8 °C	8.55	638 µS.cm^{-1}
Juin 2015	19,6 °C	8.43	665 µS.cm^{-1}

II.2. Sites d'étude au Québec

Pour cette étude, quatre sites répartis entre la région de Montréal et celle de Québec ont été sélectionnés (Figure 5.4). Le choix a été réalisé de façon à avoir un contraste de contamination entre les deux sites de chaque région. Les prélèvements ont été réalisés après la période de reproduction des moules zébrées, en octobre 2014, afin d'éviter une modulation trop importante des réponses liée à la ponte (Cf Article 1, Chapitre 3). L'échantillonnage a été réalisé avec une semaine d'intervalle entre les deux régions pour limiter la variabilité de statut reproducteur entre les populations. Les paramètres physico-chimiques de l'eau mesurés au moment des prélèvements sont regroupés dans le tableau 5.2. Les moules ont été maintenues au laboratoire pendant 24 heures dans de l'eau de leur site et à température du site, avant de les utiliser pour les expérimentations.

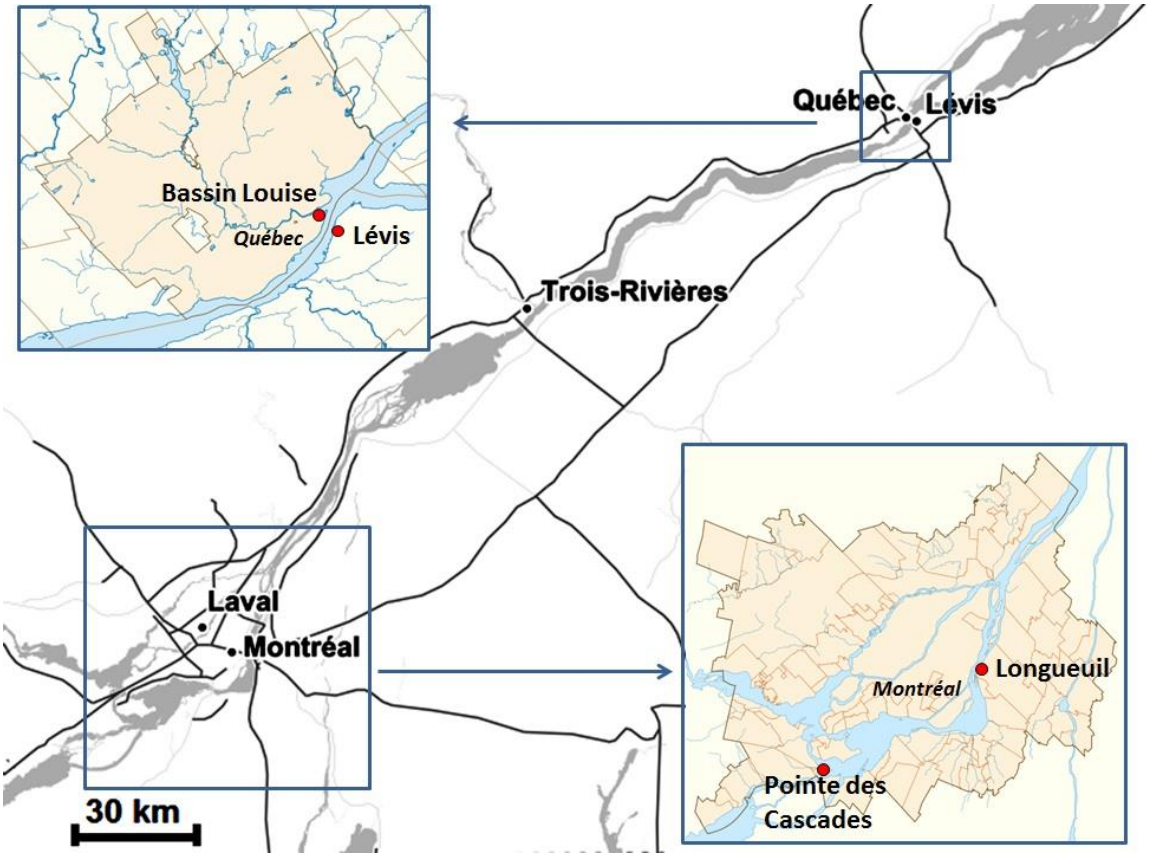


Figure 5. 4 : Répartitions des sites d'échantillonnage des moules zébrées dans le tronçon fluvial du Saint-Laurent.

Tableau 5. 2 : Paramètres physico-chimiques relevés sur les sites québécois sur le fleuve Saint-Laurent lors des prélèvements.

Site	Température	pH	O_2 dissous
Pointe-des-Cascades	11,1 °C	8.19	9,35 $mg.L^{-1}$
Longueuil	10,9 °C	8.05	9,52 $mg.L^{-1}$
Bassin Louise	12,9 °C	7.3	9.64 $mg.L^{-1}$
Lévis	13,1 °C	7.4	10,03 $mg.L^{-1}$

Dans la région de Montréal, le premier site est situé en amont de la ville de Montréal dans la municipalité de **Pointe-des-Cascades** (45°19'49.9"N, -73°58'11.8"W) sur le canal de Soulanges. Ce lieu de prélèvement représente le site ayant théoriquement le plus faible niveau de contamination chimique. Le canal alimente le Lac Saint-Louis et est situé en amont d'une zone connue de contamination localisée entre les îles de la Paix et la rive sud du Lac (Pelletier 2008). Le second site de cette région est situé dans le club nautique de **Longueuil** (45°32'05.6"N, -73°31'14.0"W). Ce site est localisé à proximité de la zone urbaine de Montréal qui est la plus grande agglomération située sur le fleuve du Saint-Laurent. Ce site sera sous l'influence des rejets urbains des villes de Montréal et de Longueuil ainsi que des rejets industriels et domestiques du secteur (Auclair 1995).

Dans la région de Québec, le port de Québec ou **Bassin-Louise** (46°49'11.4"N, -71°12'26.8"W) est un site reconnu comme étant un des plus contaminé du fleuve Saint-Laurent de par l'importance des activités portuaires et industrielles qui y sont présentes, constituant des sources de pollutions diffuses. Ce site présente une contamination importante connue en PCB, HAP, métaux et composés organométalliques (Regoli *et al.*, 1999, 2001 ; de Lafontaine *et al.*, 2000 ; Kwan *et al.*, 2003). Le second site de cette région est situé sur les quais du parc nautique Lévy situé à **Lévis** (46°47'23.2"N, -71°11'46.4"W) qui est un petit port de plaisance à proximité de Bassin-Louise mais qui présente un hydrodynamisme différent. Bien qu'il soit situé à proximité du port de

Québec, ce site est ouvert sur le fleuve et présente un taux de contamination plus faible lié à une dilution plus importante induite par le fleuve (Regoli *et al.*, 2001).

II.3. Analyses chimiques

II.3.1. Mesure de la charge en métaux dans les moules (France)

Après les prélèvements, des lots de moules ont été placés pendant 24 heures dans de l'eau de source afin de permettre la dépuration des contaminants. Les concentrations en cadmium (Cd), cuivre (Cu), plomb (Pb), nickel (Ni) et zinc (Zn) bio-accumulés dans les individus entiers ont été analysés (N=10) en spectrophotométrie d'absorption atomique à flamme (Zn) et sans flamme (Cd, Cu, Pb, Ni) d'après la méthodologie décrite dans Palais *et al.*, 2012. Les concentrations en métaux sont exprimées en µg par gramme de tissus sec ($\mu g.g^{-1}$ dw).

II.3.2. Mesure de la contamination des moules par les HAP, PCB et PBDE (Canada)

Comme pour les moules issues du site de l'Oise, une dépuration de 24 heures des organismes dans de l'eau de source a été réalisée avant d'effectuer les analyses. Les individus ont ensuite été congelés avant d'être pris en charge par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ, Pr. Mélanie Desrosiers, Pierre-Luc Cloutier) pour analyser la charge tissulaire de 45 HAP, 41 congénères de PCB et 18 congénères de PBDE. Pour chaque site, les tissus des moules (entre 10 et 15 individus) ont été mélangés afin d'obtenir 6 grammes d'échantillons frais. L'extraction des composés a été réalisée selon la méthode QuEChERS « Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe » d'après Kalachova et collaborateurs (2011) et adaptée pour les tissus de moules. L'analyse des composés a été réalisée par chromatographie sur phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse haute résolution (Cloutier *et al.*, en préparation).

II.4. Analyse des marqueurs hémocytaires

Lors de l'étude menée en France, les paramètres structuraux ont été analysés (concentration et distribution hémocytaire) ainsi que la viabilité hémocytaire et l'activité oxydative des hémocytes. Les tests ont été réalisés à l'échelle individuelle sur 10 moules à chaque prélèvement en suivant les protocoles détaillés dans le chapitre 2 du manuscrit. L'analyse des échantillons a été réalisée sur un cytomètre BD Accuri™ C6.

Lors de l'étude au Canada, les analyses des marqueurs hémocytaires ainsi que le test de sensibilité du mécanisme de phagocytose au cadmium ont été réalisés de façon strictement identique aux expérimentations menées en milieu contrôlé lors du stress de température et de pH (Chapitre 4, partie 2). Ainsi, pour chaque site, l'analyse des marqueurs structuraux et fonctionnels hémocytaires a été réalisée sur 12 moules en suivant les protocoles détaillés dans le chapitre 2 du mémoire. Le test de sensibilité au cadmium a été réalisé sur 6 pools d'hémolymphes de trois individus. Les cellules ont été exposées pour une durée totale de 21 heures aux concentrations de 0, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 5.10^{-4} et 10^{-3} M de cadmium. L'analyse des échantillons a été réalisée à l'aide d'un cytomètre BD FACScalibur.

II.5. Statistiques

Les résultats sont présentés par leur moyenne ± écart type. L'analyse statistique a été faite avec le logiciel Statistica 8.0. La normalité des données a été testée avec le test de Kolmogorov-Smirnov et l'homoscédasticité avec le test de Levene. Quand les deux conditions sont remplies, une ANOVA est appliquée sur les données pour comparer les réponses mesurées pour un même type cellulaire entre les différents sites. Si des différences entre les sites sont avérées ($p < 0,05$), un test post-hoc de Tukey est réalisé afin de déterminer les groupes homogènes.

A l'issue de l'exposition au cadmium, la concentration efficace entraînant une inhibition de 50% de la phagocytose est calculée à l'aide de la macro Excel REGTOX. Les valeurs obtenues pour chaque site ont été comparées en utilisant le test non paramétrique

Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples des rangs. Les données sont présentées par leur valeur moyenne ± écart type.

Les relations entre les paramètres mesurés lors de l'expérimentation menée au Canada ont été examinées par une analyse en composante principale (ACP). Afin d'éviter les redondances d'informations pour cette analyse, les concentrations des classes de contaminants organiques ont été considérées par leur concentration totale.

III. Résultats : Saisonnalité des réponses des biomarqueurs hémocytaires dans un contexte de pluri-contamination métallique (Bassin de la Seine)

III.1. Bioaccumulation des métaux

Les résultats des mesures de bioaccumulation des métaux dans les moules sont regroupés dans le tableau 5.3. Les résultats obtenus indiquent que les métaux les plus fortement concentrés dans les tissus sont le cuivre et le nickel quel que soit le temps de prélèvement. Pour le cuivre et le cadmium, des concentrations significativement supérieures sont mesurées au mois de décembre. Les moules analysées en mars présentent des concentrations en plomb plus faibles comparé aux autres points de prélèvement alors que dans le cas du nickel et du zinc, aucune différence significative n'est observée entre les temps de prélèvement (ANOVA, Ni : $p = 0,07$; Zn : $p = 0,820$).

III.2. Marqueurs hémocytaires structuraux et fonctionnels

III.2.1. Concentration hémocytaire

La concentration hémocytaire moyenne mesurée par moule pour les quatre prélèvements saisonniers est de 0,736 ± 0,381 $x10^6$ cellules.mL^{-1}. L'analyse statistique indique qu'il n'y a pas de différence entre les valeurs mesurées aux différents temps de prélèvement (ANOVA $p = 0,243$).

Tableau 5. 3 : Concentrations en métaux mesurées dans les tissus de dreissènes lors des différents temps de prélèvement sur le site de la rivière Oise. Les résultats sont exprimés en µg.g^{-1} de tissus secs. *Les lettres indiquent les groupes homogènes pour un même métal entre les temps*.

	Concentration µg.g^{-1} dw			
	Septembre	**Décembre**	**Mars**	**Juin**
Cu	39,27 ± 37,93 **ab**	70,81 ± 69,02 **b**	9,29 ± 1,93 **a**	17,33 ± 23,99 **a**
Cd	0,80 ± 0,41 **a**	1,55 ± 0,68 **b**	1,07 ± 0,25 **ab**	0,83 ± 0,48 **a**
Pb	0,45 ± 0,30 **a**	0,69 ± 0,33 **a**	0,16 ± 0,06 **b**	0,60 ± 1,19 **ab**
Ni	51,62 ± 40,15	49,91 ± 28,99	40,17 ± 17 ,78	22,42 ± 15,33
Zn	0,20 ± 0,06	0,22 ± 0,12	0,22 ± 0,0	0,25 ± 0,25

III.2.2. Distribution hémocytaire

La mesure de la distribution des trois types hémocytaires indique qu'il existe des différences entre les mois d'échantillonnage pour les trois types cellulaires (ANOVA, $p < 0,001$). Les hyalinocytes représentent pour tous les prélèvements le type cellulaire majoritaire. Le taux le plus bas mesuré est de 49,11 ± 21 % des hémocytes pour le prélèvement de décembre alors qu'il est en moyenne de 79,6 ± 10% pour les trois autres temps de prélèvement (Figure 5.5). Le prélèvement de décembre correspond au temps pour lequel les taux de granulocytes et de blast-like sont les plus élevés (Gr : 20,78 ± 8,79% ; BL : 30,11 ± 13,2%) alors que leur proportion est la plus faible en juin (Gr : 6,25 ± 1,80 % ; 6,64 ± 2,81%) (Figure 5.5).

III.2.3. Viabilité cellulaire

La mesure de la viabilité hémocytaire à partir du marquage à l'iodure de propidium indique des différences significatives entre les temps de prélèvement (ANOVA, $p < 0,001$). Le plus faible taux de viabilité (80,28 ± 7,93 %) est observé pour les moules échantillonnées en décembre par opposition aux moules du mois de juin où il est le plus élevé (92,3 ± 1,65 %, ANOVA, $p < 0,001$) (Figure 5.6).

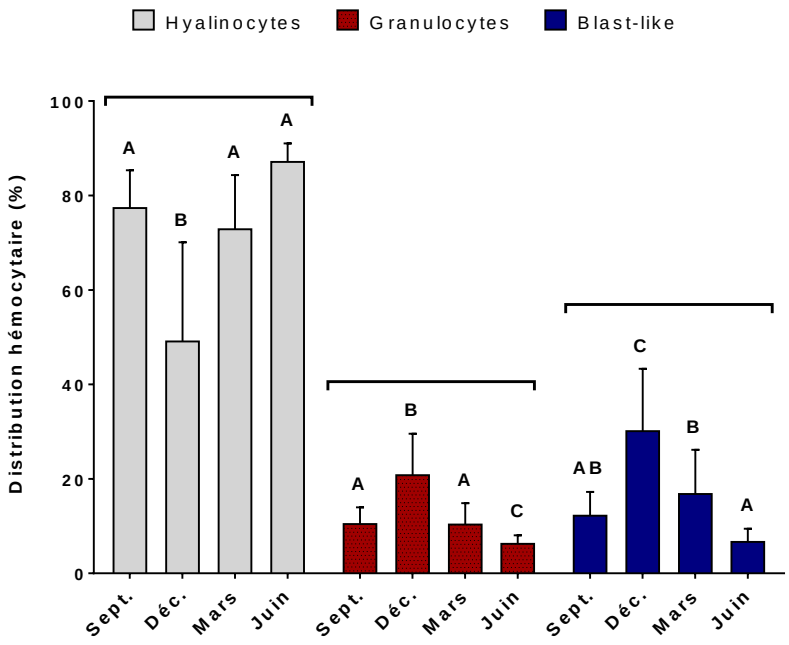


Figure 5. 5 : Distribution hémocytaire mesurée lors des différents temps de prélèvements sur le site d'étude de la rivière Oise. *Les lettres indiquent les groupes homogènes pour un même type cellulaire.*

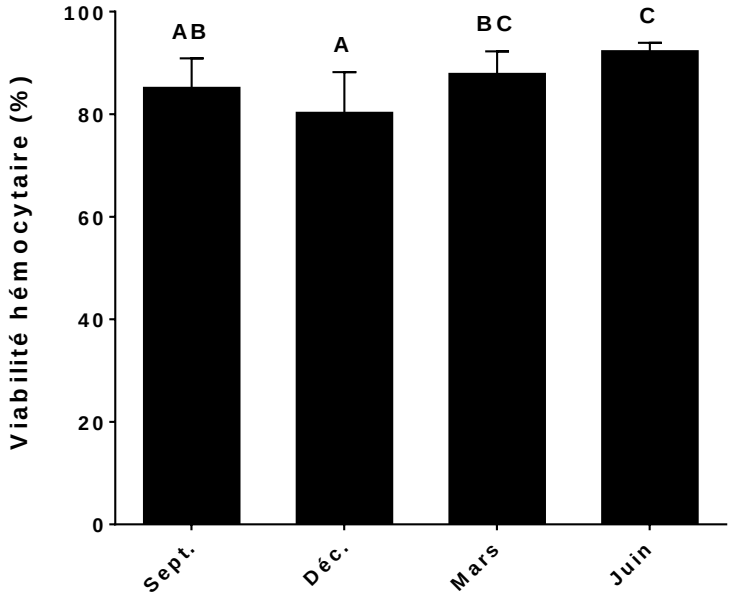


Figure 5. 6 : Viabilité hémocytaire mesurée lors des différents temps de prélèvements sur le site d'étude de la rivière Oise. *Les lettres indiquent les groupes homogènes entre les temps de prélèvement.*

III.2.4. Activité oxydative hémocytaire

L'analyse de l'activité oxydative basale hémocytaire révèle que les niveaux d'activités les plus faibles pour les trois types hémocytaires sont observables en septembre alors que les niveaux les plus forts ne sont pas observés à la même période pour tous les types cellulaires (Figure 5.7). Pour les hyalinocytes, on observe les plus fortes activités entre septembre et décembre pour ensuite rester à des niveaux similaires entre décembre et juin bien qu'une tendance à la diminution apparaisse. L'augmentation d'activité des granulocytes apparaît entre décembre et mars alors que dans le cas des hémocytes blast-like, une augmentation significative d'activité est mesurable de septembre à mars (Figure 5.7).

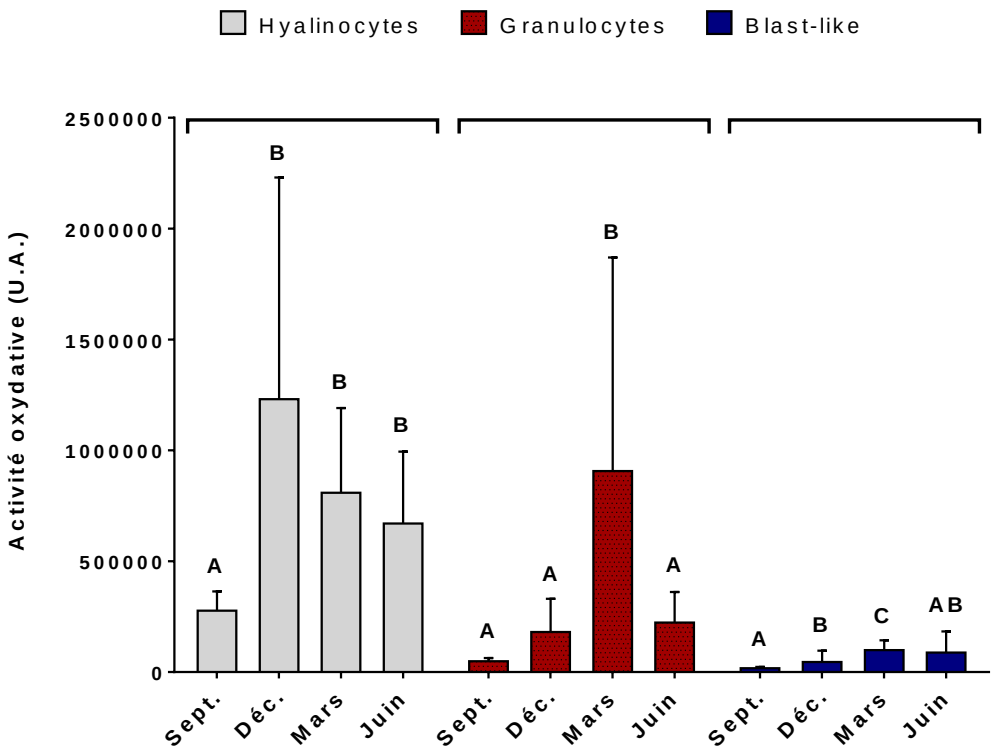


Figure 5. 7 : Activité oxydative hémocytaire mesurée lors des différents temps de prélèvements sur le site d'étude de l'Oise. *Les lettres indiquent les groupes homogènes entre les temps de prélèvement pour un même type cellulaire.*

IV. Réponses des biomarqueurs hémocytaires dans un contexte de gradient de pluri-contamination (fleuve du Saint-Laurent)

IV.1. Bioaccumulation en PCB, HAP et PBDE

Les analyses chimiques effectuées dans les tissus des moules prélevées sur les sites du fleuve Saint-Laurent, indiquent que le taux de contamination le plus faible est retrouvé à Pointe-des-Cascades aussi bien dans le sédiment que dans les tissus de moules alors que la plus forte concentration en contaminants est retrouvée à Longueuil pour le sédiment et à Bassin-Louise pour les moules. Etant donné le lien avec un faible taux de lipides mesuré dans les moules échantillonnées (< 2%), les données de contamination n'ont pas été rapportées à la quantité de lipides. Les données de contamination sont regroupées dans le tableau 5.4.

Tableau 5. 4 : Données de contaminations mesurées dans le sédiment et les tissus de moules des sites échantillonnés. *La concentration en contaminant dans le sédiment est exprimée en ng.g^{-1} de poids sec (dw) et dans les moules en ng.g^{-1} de tissus frais (ww).*

	Pointe-des-Cascades	Longueuil	Bassin-Louise	Lévis
PCB totaux				
Sédiment ng.g^{-1} dw	13,32	74,42	35,93	14,36
Moules ng.g^{-1} ww	1,89	3,87	5,56	2,76
HAP totaux				
Sédiment ng.g^{-1} dw	874,30	5044,48	2199,98	1043,26
Moules ng.g^{-1} ww	4,29	10,42	11,45	7,44
PBDE totaux				
Sédiment ng.g^{-1} dw	0,87	14,79	7,33	3,73
Moules ng.g^{-1} ww	0,04	0,65	0,77	0,65

IV.2. Marqueurs hémocytaires structuraux

IV.2.1. Concentration hémocytaire

La concentration hémocytaire moyenne mesurée dans l'hémolymphe de l'ensemble des moules issues des sites d'étude était de 0,823 ± 0,154 x10^6 cellules.mL^{-1} et n'était pas différente entre les sites (KW : *p* = 0,295) (Tableau 5.5).

IV.2.2. Distribution hémocytaire

Pour les sites de Pointe-des-Cascades, Longueuil et Bassin-Louise, les hyalinocytes représentent entre 26,84 et 30,85% des cellules totales présentes dans l'hémolymphe, ce qui est significativement inférieur à la valeur de 43,11 ± 15,34 % observée pour le site de Lévis (ANOVA : *p* = 0,013) (Tableau 5.5). Sur le site de Lévis, les hyalinocytes constituent le type hémocytaire majoritaire. Le taux de granulocytes mesuré sur les quatre sites est en moyenne de 22,41 ± 8,38 % et n'est pas différent entre les sites d'étude (ANOVA : *p* = 0,697). Les cellules blast-like constituent le type cellulaire majoritaire pour les sites de Pointe-des-Cascades (49,11 ± 18,16%), Longueuil (52,29 ± 11,51%) et Bassin-Louise (48,12 ± 13,44%). Pour le site de Lévis le taux mesuré était significativement inférieur (ANOVA : *p* =0,010) avec une moyenne de 33,08 ± 10,88% (Tableau 5.5).

IV.2.3. Viabilité cellulaire

Le taux de viabilité hémocytaire moyen mesuré sur l'ensemble des sites était de 73,24 ± 9,31% et aucune différence n'est notable entre les différents sites d'étude (ANOVA : *p* = 0,383) (Tableau 5.5).

IV.3. Paramètres hémocytaires fonctionnels

IV.3.1. Activité de phagocytose

L'étude des réponses fonctionnelles associées à la phagocytose révèle qu'il n'y a pas de différence entre les taux de phagocytose mesurés sur les quatre sites (ANOVA : Hy : p = 0,27 ; Gr : p = 0,079) (Tableau 5.5). Le taux de phagocytose moyen mesuré sur les quatre sites est de 50,23 ± 11,06 % pour les hyalinocytes et 27,45 ± 12,48% pour les granulocytes. Si l'on considère le nombre moyen de billes ingérées par les hémocytes, on observe pour les granulocytes des différences significativement plus élevées pour les granulocytes des moules issues de la région de Québec comparée aux sites de la région de Montréal (ANOVA : p = 0,018). Dans le cas des hyalinocytes, la mesure de ce paramètre indique un effet similaire avec des valeurs plus élevées pour les sites de Bassin-Louise et Lévis comparé à Pointe-des-Cascades (ANOVA : p = 0,009) (Tableau 5.5).

IV.3.2. Activité oxydative hémocytaire

Quel que soit le type cellulaire considéré, aucune différence d'activité oxydative basale n'a été observée entre les moules issues des différents sites d'étude (ANOVA : Hy : p = 0,079 ; Gr : p = 0,129 ; BL : p = 0,387) (Tableau 5.5). On notera cependant la forte dispersion des données pour ce marqueur lors de l'expérimentation.

IV.3.3. Contenu en lysosomes

Le contenu en lysosomes mesuré dans les cellules granulocytaires et blast-like ne présente pas de différences significatives entre les sites d'étude (ANOVA : Gr : p = 0,319 ; BL : p = 0,208). Pour les hyalinocytes, des différences significatives sont notables entre les moules du site de Longueuil avec des contenus en lysosomes supérieurs par rapport aux moules issues des sites de Bassin-Louise et de Lévis (ANOVA : p = 0,001) (Tableau 5.5).

IV.3.4. Activité mitochondriale

Quel que soit le type cellulaire considéré, des différences significatives du niveau d'activité mitochondriale apparaissent entre les sites (ANOVA : Hy, Gr, BL : $p < 0,001$). Les niveaux d'activités mesurés sont plus élevés pour les trois types hémocytaires des moules issues du site de Pointe-des-Cascades alors que les valeurs les plus faibles sont relevées sur les sites de la région de Québec (Bassin-Louise et Lévis). Pour le site de Longueuil, les valeurs mesurées sont significativement inférieures à celles du site de Pointe-des-Cascades mais supérieures à celles des deux autres sites pour les hyalinocytes et les granulocytes (Tableau 5.5).

IV.4. Sensibilité des hémocytes au cadmium

IV.4.1. Effets sur la viabilité hémocytaire

L'analyse des effets de l'exposition des cellules hémocytaires à des concentrations croissantes en cadmium a permis de calculer des valeurs de CE_{50} pour chaque site. La valeur moyenne calculée sur l'ensemble des sites est de $3 \pm 2 \times 10^{-3}$ M. Aucune différence de sensibilité de ce marqueur n'a été observée entre les différents sites d'étude (K-W : $p = 0,605$) (Figure 5.8).

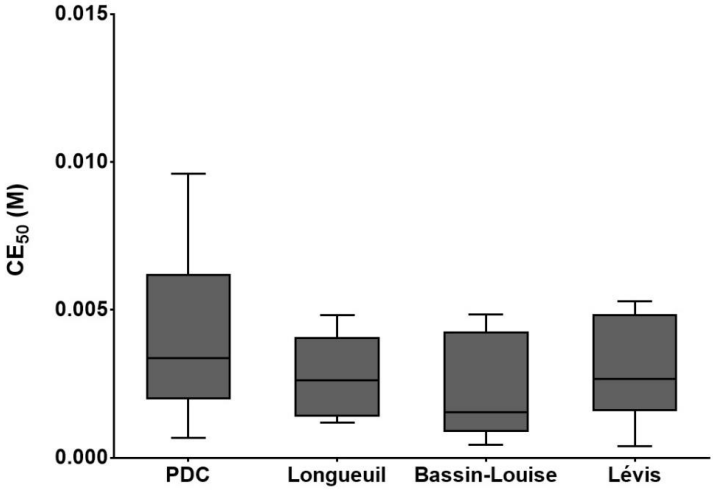


Figure 5. 8 : CE_{50} sur la viabilité hémocytaires calculées pour les sites échantillonnés sur le fleuve Saint-Laurent.

Tableau 5. 5 : Paramètres hémocytaires mesurés chez les moules zébrées issus des sites d'études du Saint-Laurent. *Les résultats sont exprimés par leur valeur moyenne ± écart type. Les lettres majuscules indiquent les groupes homogènes entre les sites pour un même type cellulaire.*

Paramètres	Type cellulaire	Sites			
		Pointe-des-Cascades	**Longueuil**	**Bassin-Louise**	**Lévis**
Concentration hémocytaire ($x10^6$ cellules.mL^{-1})		0,875 ± 0,169	0,813 ± 0,155	0,854 ± 0,129	0,750 ± 0,151
Distribution hémocytaire (%)	Hy	26,84 ± 13,83 **A**	26,84 ± 10,28 **A**	30,85 ± 11,64 **A**	43,11 ± 15,34 **B**
	Gr	24,05 ± 8,43	20,88 ± 4,65	21,03 ± 8,28	23,81 ± 11,61
	BL	49,11 ± 18,16 **A**	52,29 ± 11,51 **A**	48,12 ± 13,44 **A**	33,08 ± 10,88 **B**
Viabilité (%)		71,27 ± 9,76	71,40 ± 7,24	73,32 ± 12,18	77,32 ± 6,78
Taux de phagocytose (%)	Hy	50,76 ± 11,44	54,03 ± 11,29	46,28 ± 7,75	49,88 ± 13,11
	Gr	26,61 ± 8,54	25,20 ± 13,13	26,96 ± 12,71	31,05 ± 15,43
Nombre moyen de billes	Hy	13 ± 5,57 **A**	17,57 ± 7,11 **AB**	21,91 ± 13,30 **B**	24,84 ± 12,81 **B**
	Gr	6,57 ± 4,62 **A**	6,27 ± 4,48 **A**	14,68 ± 13,57 **B**	16,53 ± 11,95 **B**
Activité oxydative (U.A.)	Hy	2648,40 ± 2759,08	2565,43 ± 2458,93	1298,94 ± 1417,27	574,72 ± 424,40
	Gr	1879,17 ± 1751,65	1753,54 ± 1978,59	831,84 ± 936,44	686,12 ± 819,91
	BL	76,24 ± 113,77	72,26 ± 75,61	44,19 ± 46,58	31,16 ± 36,51
Contenu en lysosomes (U.A.)	Hy	106,93 ± 78,29 **AB**	125,59 ± 44,96 **A**	73,89 ± 18,91 **B**	65,86 ± 52,37 **B**
	Gr	211,27 ± 121,16	199,04 ± 86,80	158,82 ± 135,44	185,61 ± 121,55
	BL	18,57 ± 5,61	18,77 ± 4,06	15,29 ± 6,07	19,57 ± 4,45
Activité mitochondriale (U.A.)	Hy	102,60 ± 32,14 **A**	71,25 ± 16,75 **B**	44,99 ± 17,02 **C**	33,69 ± 17,56 **C**
	Gr	214,50 ± 56,60 **A**	164,72 ± 29,19 **B**	109,39 ± 33,82 **C**	76,94 ± 18,29 **C**
	BL	50,21 ± 17.21 **A**	36,27 ± 10,92 **B**	28,32 ± 7,35 **B**	26,48 ± 9,25 **B**

IV.4.2. Effets sur l'activité de phagocytose hémocytaire

Le cadmium exerce une inhibition de l'activité de phagocytose de façon dose dépendante. Les CE_{50} calculées pour ce marqueur sont significativement différentes entre les sites si l'on considère les résultats obtenus pour les cellules hyalinocytaires (K-W : p = 0,006). La CE_{50} calculée pour le site de Bassin-Louise indique une sensibilité plus importante comparé aux résultats des sites de la région de Montréal (Bassin-Louise : 0,21 ± 0,054 x10^{-3} M ; Pointe-des-Cascades : 2,84 ± 3,18 x10^{-3} M et Longueuil : 1,3 ± 0,45 x10^{-3} M) (Figure 5.9 A). Avec une CE_{50} moyenne calculée de 0,77 ± 0,9 x10^{-3} M entre les sites, les effets engendrés par le cadmium sur la phagocytose des granulocytes ne sont pas significativement différents entre les sites bien qu'une tendance apparaisse (K-W : p = 0,058) (Figure 5.9 B).

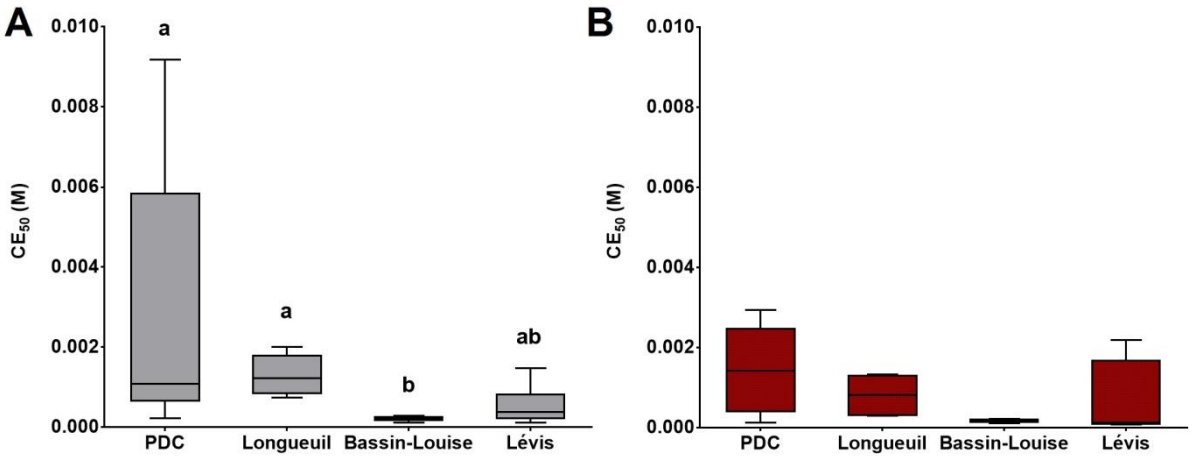


Figure 5. 9 : CE_{50} sur l'activité de phagocytose des (A) hyalinocytes et (B) granulocytes calculées pour les sites échantillonnés sur le fleuve Saint-Laurent. *Les lettres indiquent les groupes homogènes entre les sites (K-W. $p < 0,05$).*

IV.5. Analyses multivariées

Les résultats de l'analyse en composante principale en utilisant les réponses biologiques et la contamination en polluants organiques révèlent que le premier axe

formé explique plus de 63% de la variance. Il est formé principalement par les marqueurs fonctionnels hémocytaires (Figure 5.10 A). Cet axe apparaît comme étant associé à une différence liée aux régions d'étude avec les sites de Bassin-Louise et Lévis de la région de Québec opposés aux sites de Pointe-des-Cascades et Longueuil de la région de Montréal (Figure 5.10 B). Le second axe est principalement formé par les données de contamination et le taux de granulocytes explique plus de 26% de la variance observée. On notera l'opposition entre des marqueurs associés plutôt au métabolisme des cellules comme l'activité mitochondriale avec la capacité de phagocytose des hémocytes. Ceci suggère que cette fonction est altérée lorsque l'activité mitochondriale est forte, ce qui peut traduire un stress métabolique cellulaire. Les résultats de l'ACP suggèrent également une forte indépendance entre les données de contamination et les marqueurs hémocytaires métaboliques contrairement au taux de granulocyte qui semble être plus spécifique de la contamination organique. On notera également le fort lien entre le taux de hyalinocytes et la viabilité qui peuvent traduire un bon état physiologique des cellules.

V. Discussion

Les objectifs des travaux présentés dans ce chapitre étaient de mieux comprendre les relations existantes entre les facteurs environnementaux et les paramètres hémocytaires mais aussi d'examiner dans quelle proportion la contamination chimique des individus module les réponses mesurées. Les travaux présentés constituent les premières études *in situ* basées sur l'analyse multi-paramétrique des réponses hémocytaires de la moule zébrée dans un contexte de contamination chimique variée. Compte tenu du fait que ces analyses sont les premières chez la dreissène, nous ne disposons pas de résultats issus de la littérature comme point de comparaison. Par conséquent, lors de l'étude menée en France, le prélèvement de référence que nous pouvons retenir est le mois de septembre correspondant à la période de repos sexuel qui est associée à des contraintes physiologiques moindres (Palais *et al.*, 2011 ; Knigge *et al.*, 2014). Pour les études menées au Québec, la contamination en composés organiques des sédiments la plus faible est retrouvée à Pointe-des-cascades ce qui constituera notre site de référence. Les analyses indiquent également que pour chaque

région d'étude (Montréal et Québec) nous disposons de deux sites avec une physico-chimie proche mais avec une contamination contrastée ce qui permet d'étudier l'influence de la pollution pour une même région. Les mesures réalisées dans cette étude ont permis l'observation de variations temporelles des niveaux de réponses des marqueurs sur le site français mais également spatiales, en lien avec des niveaux variés en contamination chimique, dans le cas de l'étude menée au Canada. Les effets sur les biomarqueurs hémocytaires des paramètres du milieu mais aussi de paramètres intrinsèques aux organismes, sont discutés dans cette partie.

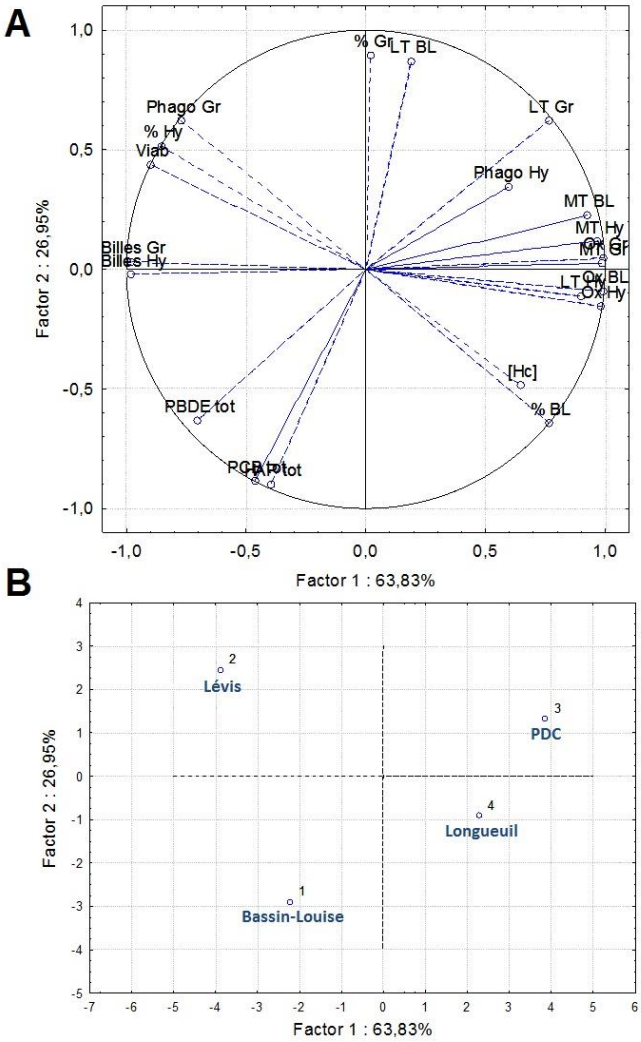


Figure 5. 10 : Représentation graphique des descripteurs chimiques et biologiques (A) et des sites d'étude (B) dans les deux premiers facteurs de l'ACP. Hy : hyalinocyte, Gr : granulocytes, BL : blast-like, LT : contenu en lysosomes, MT : activité mitochondriale, Ox : activité oxydative, % : distribution, viab : viabilité.

V.1. Rôle possible du statut reproducteur

Chez les mollusques, la température conditionne l'évolution de la gamétogenèse. Par conséquent, les liens entre certains facteurs intrinsèques et extrinsèques peuvent être étroits ce qui rend difficile l'isolement des effets associés à la reproduction uniquement. Bien que l'ensemble des marqueurs fonctionnels n'ait pas pu être mesuré lors de l'étude menée en France, les résultats obtenus sur les paramètres structuraux indiquent des fluctuations de réponse au cours de l'année. Lors de notre étude, la concentration hémocytaire mesurée était constante entre les différents temps de prélèvement mais la distribution des trois types cellulaires variait significativement. Le contraste le plus important est observé au mois de décembre qui correspond à la reprise de gamétogenèse et pour lequel le taux de hyalinocytes est plus faible comparativement aux autres mois et notamment en juin en période de ponte où le taux de hyalinocytes est le plus élevé. Bien que la distribution hémocytaire soit différente de l'étude présentée dans le chapitre 3 de ce manuscrit (article n°1), la tendance observée est similaire ce qui vient confirmer nos précédentes observations. Ce taux de hyalinocytes plus faible est associé à un taux de viabilité cellulaire plus faible dans le cas de l'étude sur la rivière Oise ce qui n'était pas le cas dans le premier article. Les différences de concentration et distribution hémocytaires entre nos deux études peuvent provenir de plusieurs facteurs comme la génétique des populations étudiées ou la contamination du site d'étude mais nous ne pouvons pas déterminer pour le moment d'où proviennent ces différences. D'après les analyses menées *in situ* ou en milieu contrôlé, nous pouvons supposer que la température est un paramètre qui influence peu la distribution hémocytaire. Plusieurs études utilisant différentes espèces de mollusques relatent une saisonnalité des réponses hémocytaires chez les mollusques. Ceci a été observé pour les paramètres structuraux de *Ruditapes philippinarum* (Soudant *et al.*, 2004 ; Fly-Sainte-Marie *et al.*, 2009) et *Crassostrea gigas* où un plus fort taux de mortalité hémocytaire a été observé pendant la ponte (Duchemin *et al.*, 2007). Nous pouvons ainsi supposer que la reproduction influence plus grandement les biomarqueurs hémocytaires structuraux. Dans le cas de notre étude, le taux de viabilité hémocytaire est plus faible au moment de la reprise de gamétogenèse en décembre et augmente de façon progressive pour

atteindre un taux de viabilité plus élevé au moment de la ponte. L'étude présentée dans l'article n°1 de ce manuscrit indique qu'entre la période de gamétogenèse et la ponte, la viabilité hémocytaire est identique. Ces deux périodes correspondent aux échantillonnages de mars et juin lors de l'étude *in situ* sur la rivière Oise pour lesquels la viabilité hémocytaire mesurée est également similaire ce qui confirme nos premières observations.

La mesure de l'activité oxydative hémocytaire indique également des variations au cours de l'année. Nos résultats indiquent que cette activité est plus forte en hiver et au printemps pour les hyalinocytes et une diminution de l'activité est visible au moment de la période de reproduction en juin dans le cas des granulocytes, ce qui rejoint les observations de l'article n°1. Ces modulations d'activité peuvent être liées à des fluctuations saisonnières des activités enzymatiques anti-oxydantes. En effet, il a été observé chez *Mytilus galloprovincialis* une plus forte activité anti-oxydante chez les individus en période de ponte comparé à la période de gamétogenèse pour laquelle ces activités sont plus faibles (Borković *et al.*, 2005 ; Bocchetti & Regoli 2006). Un lien entre l'activité oxydative hémocytaire et les fluctuations des niveaux d'activités des enzymes anti-oxydantes pourrait expliquer les effets fluctuations observées au niveau hémocytaire. Cependant, des travaux récents menés chez *Dreissena polymorpha* indiquent une diminution de l'activité CAT et SOD en période de ponte ce qui ne permet pas d'expliquer la baisse d'activité oxydative hémocytaire (Faria *et al.*, 2014). Ceci suggère que d'autres mécanismes sont impliqués dans ces modulations d'activités.

D'après les données obtenues et celles issues de la littérature, il apparaît que la période de ponte constitue une période critique lors de laquelle les individus présentent des niveaux de réponses faibles ainsi que des réserves énergétiques réduites. Chez la dreissène, ce processus physiologique se déroule en saison chaude lors de laquelle l'augmentation de la température peut générer un stress supplémentaire. Pour déterminer plus précisément le lien entre la gamétogenèse et l'évolution des paramètres hémocytaires, la mise en place d'une étude permettant un suivi plus régulier sur l'année devrait permettre de mieux comprendre ces interactions physiologiques qui semblent constituer un facteur confondant majeur pour les activités hémocytaires.

V.2. Effets de la contamination chimique

L'analyse des contaminations chimiques, métalliques ou organiques, met en évidence que les moules zébrées sont exposées à des mixtures très complexes en polluants. Les mesures d'accumulation en contaminants organiques sur le fleuve du Saint-Laurent indiquent des taux de lipides faibles, caractéristiques d'individus en post-ponte. Les changements de composition en lipides peuvent entraîner des variations de bioaccumulation des polluants organiques en fonction de la période d'échantillonnage, ce qui est moins vrai pour les métaux qui ne s'accumulent pas particulièrement dans les lipides (Kwan *et al.*, 2003). Des analyses réalisées en 2013 par le CEAEQ plus tôt dans l'année indiquent que la charge en contaminants organique était plus importante chez les moules zébrées échantillonnées avant la période de reproduction. Ces modulations ont également été observées lors d'une étude menée en Espagne chez la dreissène qui indique des forts effets saisonniers sur la charge en contaminants accumulés (Faria *et al.*, 2014).

L'analyse de la sensibilité des cellules hémocytaires au cadmium, chez les individus prélevés sur les différents sites d'étude sur le fleuve Saint-Laurent, indique que la viabilité cellulaire est affectée de façon similaire suite à l'exposition à des doses croissantes en cadmium, quel que soit le site considéré. Cependant, les effets sur le mécanisme de phagocytose diffèrent selon le site de prélèvement et démontrent une sensibilité plus importante chez les moules issues du site de Bassin-Louise. Ce site a été décrit comme présentant le plus fort taux de contamination par les métaux et notamment en cadmium, parmi 13 sites d'étude (Kwan *et al.*, 2003). La mesure de biomarqueurs chez des dreissènes prélevées sur ces mêmes sites révèle des niveaux de plus élevés de métallothionéines, de dommages à l'ADN et de peroxydation lipidique pour le site de Bassin-Louise comparé aux autres (de Lafontaine *et al.*, 2000). D'après nos résultats, bien que les taux de phagocytose mesurés soient similaires entre les différents sites, il apparait que les individus issus du site historiquement reconnu pour sa forte contamination présentent une sensibilité accrue au cadmium. Des travaux utilisant la méthodologie « stress on stress » chez les moules, par mesure du temps de survie à

l'air, indiquent des tendances similaires avec une capacité de survie réduite chez les individus provenant de sites contaminés (Hellou & Law 2003 ; Pampanin *et al.*, 2005).

Les résultats obtenus au travers de l'analyse en composante principale indiquent que les données de contamination chimiques sont largement indépendantes de la majorité des données biologiques. Si l'on considère la représentation des variables associées aux paramètres structuraux hémocytaires au sein de l'ACP, on observe une opposition forte entre le taux de blast-like et les cellules hyalinocytaires qui sont associées aux données de viabilité. Nous pouvons donc penser qu'un fort taux de mortalité hémocytaire se traduira par un taux plus faible de hyalinocytes qui est compensé par des cellules blast-like pour assurer un renouvellement cellulaire. Le taux de granulocytes semble être associé aux variables de contamination organique. L'opposition est également très marquée entre la contamination en PBDE et le contenu lysosomal des granulocytes. Ceci recouperait les informations obtenues dans l'article n°2 qui indiquait une implication plus forte des granulocytes dans la séquestration du cadmium. L'hypothèse que nous pouvons émettre est qu'en réponse à la contamination organique, les moules vont induire une réponse de séquestration des polluants au niveau des lysosomes *via* l'action des granulocytes. Des expérimentations complémentaires seront nécessaires pour déterminer plus précisément les modes d'actions en réponse aux contaminants mais ces premiers résultats appuient l'intérêt d'étudier aussi bien les marqueurs structuraux que fonctionnels hémocytaires lors d'études de biosurveillance.

VI. Conclusion

Dans l'environnement, les organismes subissent en permanence les fluctuations des conditions du milieu et sont exposés à de multiples contaminants chimiques impliqués dans des mécanismes de toxicité pouvant engendrer des effets multiples. Les analyses chimiques menées ne sont jamais exhaustives et de nombreux autres types de polluants ou des facteurs naturels peuvent affecter la physiologie des espèces peuplant les écosystèmes. Plusieurs études indiquent que la contamination du milieu et les réponses physiologiques des mollusques suivent un schéma saisonnier souvent associé

à la reproduction et que les réponses à un polluant pourront être modulées selon le statut reproducteur. De plus, compte tenu du rôle central des hémocytes aussi bien dans la physiologie des mollusques et dans la réponse aux contaminants, il apparait normal que les réponses hémocytaires soient dépendantes de la saisonnalité en lien avec le statut reproducteur.

Ces travaux reflètent les difficultés de séparer les effets naturels liés à des mécanismes intrinsèques des causes anthropogéniques pouvant influencer la réponse des marqueurs mesurés. Cette distinction est cruciale en écotoxicologie afin d'éviter les erreurs d'interprétation de résultats pouvant mener à des conclusions erronées. Les résultats obtenus au travers de ces deux premières études ne permettent pas de conclure avec certitude du poids des facteurs intrinsèques et environnementaux sur les modulations des paramètres hémocytaires observées. Cependant, de par les approches spatiales et temporelles employées pour l'échantillonnage des moules, nous pouvons en déduire que les facteurs environnementaux, intrinsèques et la pollution vont influencer les niveaux de réponse chez la moule zébrée. Par conséquent, il est important de tenir compte du facteur reproduction dans l'analyse des niveaux de réponse des biomarqueurs en écotoxicologie chez cette espèce. Ces expérimentations permettent également de valider la faisabilité et l'utilisation des marqueurs hémocytaires sur des populations naturelles pour étudier les contaminations *in situ*. La multiplication des observations couplée à l'utilisation d'approches complémentaires, notamment *via* le monitoring actif devraient permettre d'améliorer la compréhension de l'influence des paramètres intrinsèques et extrinsèques sur la physiologie hémocytaire de façon à augmenter significativement le pouvoir discriminant de ces marqueurs dans un contexte de biosurveillance.

Partie 2 : Comparaison des réponses hémocytaires chez *Dreissena polymoropha* et *Dreissena rostriformis bugensis*

I. Introduction

Lors des expérimentations *in situ*, il a été observé la présence sur les différents sites québécois de deux espèces de dreissénidés vivant en sympatrie. La moule zébrée *Dreissena polymorpha* et la moule quagga *Dreissena rostriformis bugensis* sont toutes deux originaires de la région Ponto-Caspienne bien que la seconde possède une aire de répartition initiale limitée à l'estuaire de Dniepr en Mer Noire (Karatayev *et al.*, 2013). La colonisation de l'Europe par la moule zébrée a été initiée dès les années 1800 alors que la moule quagga a été observée en dehors de sa région native uniquement à partir des années 1940 mais sa progression s'est faite à un rythme exponentiel (Karatayev *et al.*, 2013). En Amérique du Nord, la moule quagga a été observée pour la première fois en 1991 dans le Lac Erié soit deux ans après les premières observations de moules zébrées (Hébert *et al.*, 1989 ; May & Marsden 1992).

Ces deux espèces peuvent être dans certains cas relativement difficiles à différencier à cause de leur importante variabilité morphologique. La coquille de *Dreissena polymorpha* en partie dorsale forme un angle plus net et possède une partie ventrale plate alors que *Dreissena rostriformis bugensis* possède une coquille moins anguleuse et une partie ventrale plutôt convexe. La moule quagga possède également des valves asymétriques qui ne sont pas toujours parfaitement jointes (Figure 5.11) (Domm *et al.*, 1993). Outre ces différences morphologiques, la moule quagga possède deux phénotypes en fonction de sa profondeur d'habitat (Claxton *et al.*, 1998). Les quagga des eaux profondes présentent un morphotype pour lequel les valves sont latéralement plus aplaties et plus ovale que celles des eaux peu profondes (Figure 5.12) (Peyer *et al.*, 2010).

Ces dreissénidés possèdent des traits biologiques et écologiques communs mais leurs besoins environnementaux sont différents pour certains facteurs. Les températures tolérées par les deux espèces sont différentes. En effet, des expériences en laboratoire

consistant en une augmentation de température croissante d'animaux acclimatés à différentes températures a permis de détecter que la moule quagga était plus sensible aux fortes températures (Spidle *et al.*, 1995). Ainsi, la limite haute de tolérance de température de *D. bugensis* est inférieure de 2 à 5°C, selon l'étude considérée, comparée à celle de *D. polymorpha* qui se situe autour de 30°C (Domm *et al.*, 1993 ; Mills *et al.*, 1996 ; Karatayev *et al.*, 1998).

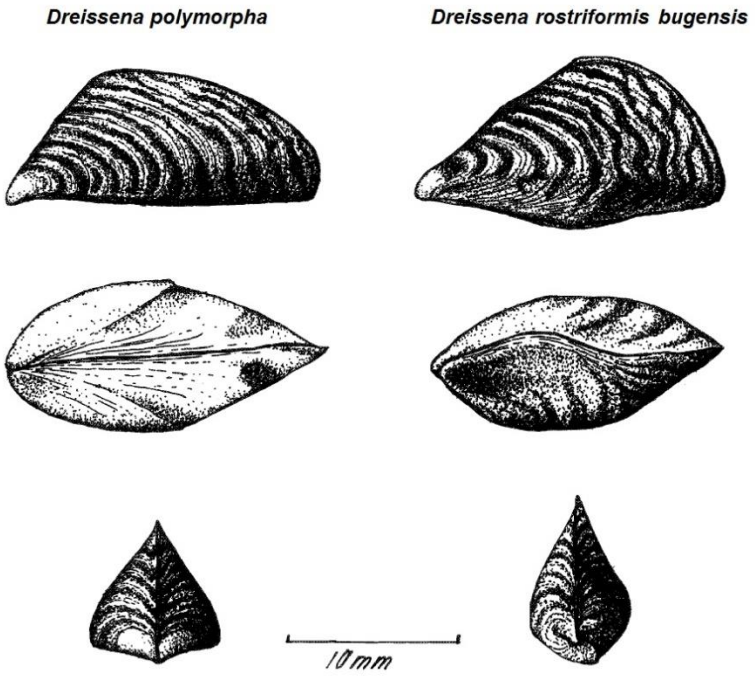


Figure 5. 11 : Vues latérales, ventrales et antérieures montrant les différences morphologiques entre *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis*. D'après Domm *et al.*, 1993.

Ces différences de tolérance de température ont plusieurs conséquences sur la biologie de ces espèces, notamment sur leur fonction de reproduction avec une température à laquelle la ponte est induite de 9°C pour *D. bugensis* et de 12°C pour *D. polymorpha* (Roe & MacIsaac 1997 ; Claxton & Mackie 1998). Comparée à la moule zébrée, la moule quagga possède une meilleure efficience énergétique. En effet, elle possède un

taux de filtration plus important que la moule zébrée et cette différence est accentuée lors de la saison froide ce qui aboutit à une croissance supérieure de *D. bugensis* comparativement à *D. polymorpha* (Diggins *et al.*, 2001 ; Baldwin *et al.*, 2002). Pour le calcium, il apparaît que les besoins de la moule quagga sont plus importants que pour la moule zébrée. *D. bugensis* peut tolérer des concentrations plus fortes en calcium mais la valeur seuil pour son développement est plus haute que celle de *D. polymorpha* (Zhulidov *et al.*, 2004 ; Jones & Ricciardi 2005).

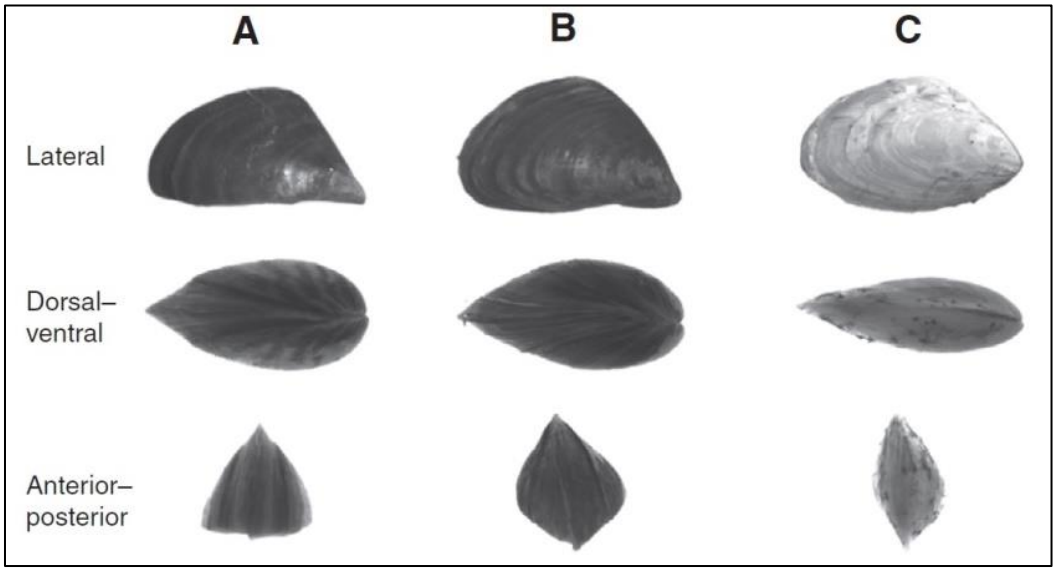


Figure 5. 12 : Vues latérales, dorso-ventrales et antéro-postérieure de *Dreissena polymorpha* (A), *Dreissena rostriformis bugensis* de morphotype d'eaux peu profondes (B) et d'eau profondes (C). D'après Peyer *et al.*, 2011.

Leur répartition spatiale est différente dans les milieux colonisés. En effet, *D. polymorpha* a besoin de substrats durs pour se fixer et est peu abondante dans les eaux profondes alors que *D. rostriformis bugensis* peut coloniser des substrats plus fins et des zones plus profondes (>50 m) (Karatayev *et al.*, 2011). Il a été observé que dans la plupart des écosystèmes où ces deux espèces sont présentes, la moule quagga supplantait dans le temps la moule zébrée et devenait l'espèce dominante (Ricciardi & Whoriskey 2004 ; Patterson *et al.*, 2005 ; Wilson *et al.*, 2006 ; Watkins *et al.*, 2007 ; Zhulidov *et al.*, 2010 ; Karatayev *et al.*, 2014a). Ce remplacement de *D. polymorpha* par

D. bugensis peut être lié à plusieurs caractéristiques comme une alimentation active durant l'hiver ou en profondeur dans les eaux entre 0,5 et 5° C, à un métabolisme plus lent et une assimilation plus efficace et la possibilité de coloniser une plus grande variété de substrats (Baldwin *et al.*, 2002 ; Stoeckmann 2003 ; Cuhel & Aguilar 2013).

Ces différences physiologiques peuvent amener des questionnements quant à l'utilisation de ces deux espèces sans distinction dans un contexte de surveillance environnementale. Une hétérogénéité dans les résultats d'études comparant la bioaccumulation de contaminants entre les deux espèces est notable. Lors d'expositions de 24 heures réalisées en laboratoire, il a été observé une accumulation plus rapide du cadmium par la moule quagga comparativement à la moule zébrée (Roseman *et al.*, 1994). Ces résultats sont concordants avec une étude *in situ* qui indique des résultats similaires pour l'accumulation de ce métal non essentiel par les moules quagga (Johns & Timmerman 1998). A l'opposé, Richman et Somers (2005) ont observé une accumulation plus importante du cadmium chez *D. polymorpha* alors que d'autres travaux indiquent une accumulation identique de ce métal entre les deux espèces (Mills *et al.*, 1993). Dans plusieurs études, des concentrations plus importantes en métaux essentiels comme le cuivre ont été mesurées chez *Dreissena polymorpha* (John & Timmerman 1998 ; Rutzke *et al.*, 2000 ; Richman & Somers 2005 ; Matthews *et al.*, 2015) alors que pour d'autres métaux, les résultats sont variables. Ainsi, il a été mesurée une concentration tissulaire plus forte en zinc et chrome ou en manganèse chez *D. polymorpha* (Mills *et al.*, 1993 ; Rutzke *et al.*, 2000 ; Richman & Somers 2005).

Peu d'études se sont intéressées aux différences de réponses biologiques entre les deux espèces. Les travaux de Schäfer et collaborateurs (2012) ont permis de mettre en avant une accumulation plus importante de composés organochlorés par la moule quagga. Cette même étude s'est également intéressée au contenu en protéine HSP70 ainsi qu'aux dommages à l'ADN dans les branchies. Les résultats indiquent un contenu en protéines HSP70 plus importants chez *D. polymorpha* alors que les niveaux de base des dommages à l'ADN sont plus élevés chez *D. rostriformis bugensis*.

Ces différences d'accumulation des contaminants suggèrent qu'elles peuvent être exposées à des charges toxiques différentes ce qui peut potentiellement influencer les

réponses de biomarqueurs. Ceci souligne donc l'importance d'étudier si le facteur espèce constitue un facteur confondant important pour l'utilisation des biomarqueurs hémocytaires développés chez les dreissénidés en surveillance environnementale. Afin de répondre à cette problématique, des individus de chaque espèce ont été prélevés sur trois sites québécois afin de réaliser des mesures des marqueurs hémocytaires. La sensibilité des cellules hémocytaires à l'exposition au cadmium a également été réalisée dans le but de déterminer si la viabilité des hémocytes est affectée de la même façon par ce toxique. Afin d'éviter les biais d'identification d'espèce basés sur les analyses morphologiques, une analyse du polymorphisme de longueur de fragment de restriction (ou Restriction Fragment Length Polymorphism en anglais : RFLP) a été réalisée pour s'assurer de l'identification de l'espèce.

II. Matériels et méthodes

II.1. Analyse de la contamination des moules par les HAP, PCB et PBDE

L'analyse de la charge en contaminants organiques a été réalisée par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ, Pr. Mélanie Desrosiers) de façon identique à la méthodologie présentée dans la partie 1 du chapitre 5. L'identification de l'espèce des individus utilisés pour constituer les échantillons à analyser repose uniquement sur la base de critères morphologiques. Les analyses ont été réalisées pour les PCB indicateurs, certains HaP prioritaires et les PBDE 47 et 99 qui sont les plus abondants (UNEP 2007).

II.2. Prélèvement des moules, analyse des marqueurs hémocytaires

Les moules ont été échantillonnées sur les sites de Pointe-des-cascades, Bassin Louise et Lévis en octobre 2014 lors de l'échantillonnage réalisé dans la partie 1 de ce chapitre de ce mémoire. Pour cette expérimentation, une première identification morphologique, basée sur la forme des valves, a été réalisée afin de disposer d'un effectif équilibré de

chaque espèce pour les marqueurs étudiés. Des individus homogènes en taille ont été sélectionnés pour les sites de Pointe-des-cascades (*D.p* : 22,97 ± 2,47 mm ; *D.b* : 23,85 ± 1,36 mm p = 0,352) et Bassin Louise (*D.p* : 23,7 ± 2,05 mm ; *D.b* : 24,27 ± 1,5 mm p = 0,194). Pour le site de Lévis, les différences de taille des deux espèces étaient trop importantes pour constituer des groupes homogènes (*D.p* : 23,79 ± 1,36 mm ; *D.b* : 24,94 ± 1,2 mm p = 0,011).

L'hémolymphe des individus a été utilisée pour l'analyse des marqueurs hémocytaires (N = 10 par espèce) et la sensibilité des hémocytes au cadmium (N = 8 par espèce). L'ensemble des tissus sont conservés dans de l'éthanol 70° afin de procéder à l'identification génétique des deux espèces.

L'analyse des marqueurs fonctionnels hémocytaires (concentration et distribution hémocytaire, viabilité, phagocytose, activité oxydative, contenu lysosomal et activité mitochondriale) a été réalisée de façon identique à l'étude précédente (Chapitre 5 partie 1). Seule différence, pour le test de sensibilité au cadmium, aucun pool d'hémocytes n'a été fait pour éviter tout mélange entre les deux espèces. Par conséquent, seule l'analyse de la viabilité a été réalisée suite à l'exposition au toxique.

II.3. Identification des espèces

L'identification des espèces de dreissénidés prélevées a été réalisée par analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) de la séquence codant pour la sous-unité I de la cytochrome C oxydase mitochondriale (COI).

II.3.1. Isolement de l'ADN génomique

L'ADN génomique total est extrait à partir de manteaux et branchies des moules. Environ 50 mg de tissus (branchies et manteau) sont prélevés et incubés pendant 3 heures à 55°C dans 935µL de tampon de lyse (Tris EDTA NaCl, 1,3% de dodécylsulfate de sodium (SDS) et 0,1 $mg.mL^{-1}$ de protéinase K). Du NaCl 5M est ajouté à l'homogénat avant centrifugation (3000*g,* 10 minutes). Le surnageant est ensuite récupéré pour être

purifié deux fois par ajout de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1). La phase aqueuse est récupérée, avant précipitation de l'ADN par ajout d'éthanol absolu froid. Après centrifugation (12000g, 4°C, 30 min), le culot d'ADN est repris dans 50µL d'eau PCR.

II.3.2. Réaction de PCR

Les amorces utilisées pour amplifier le fragment de 710 pb ont été choisies à partir de Voroshilova *et al.*, 2010 (Tableau 5.6). Pour chaque réaction de PCR, un volume total de 25µL a été utilisé contenant 0,02 $U.\mu L^{-1}$ de Taq polymérase, 40 µM de dNTP, 4.10^{-4} $pmol.\mu L^{-1}$ de chaque amorce, 2mM $MgCl_2$, du tampon 10x et de l'eau ultra pure stérile. 35 cycles de PCR sont réalisés (Dénaturation : 94°C, 50 sec ; hybridation : 56°C, 60 sec ; élongation : 72°C, 60 sec) en utilisant 1 µL d'ADN purifié.

Tableau 5. 6 : Amorces utilisées dans l'étude

Nom amorce	Séquence
COI-UnivF	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
COI-UnivR	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATC-3'

II.3.3. RFLP

L'analyse des fragments de restriction de la région du gène COI est réalisée en utilisant l'enzyme *RSA I*. Le mélange réactionnel pour la digestion des produits PCR par l'enzyme de restriction est composé de 5 µL de produit issu de l'amplification PCR, 17 µL d'eau ultra pure stérile, 2,5 µL de tampon de l'enzyme de restriction et 0,5 µL d'enzyme (concentration finale 0,2 $U.\mu L^{-1}$). Le mélange est placé à digérer pendant une heure à 37°C avant l'électrophorèse en gel d'agarose 2% (w/v). La migration est réalisée dans du TBE 0,5X et les fragments d'ADN sont ensuite marqués au bromure d'éthidium avant d'être révélés sous lumière UV.

II.4. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Minitab® 16.1.1. Le calcul de CE_{50} du cadmium sur la viabilité hémocytaire est réalisé à l'aide de la macro Excel REGTOX v7.0.6. La normalité des données a été testée avec le test Kologorov-Smirnov. Les réponses des biomarqueurs ont été comparées entre les deux espèces pour chaque site et pour chaque type cellulaire de façon indépendante à l'aide d'un test t de Student. Les résultats sont exprimés en valeur moyenne ± écart type. Lors de l'analyse des données de contamination précédemment décrite (Chapitre 5, partie 1), la charge en contaminants organiques a été réalisée chez les deux espèces sur la base d'identification visuelle à partir de la morphologie des coquilles.

III. Résultats

III.1. Bioaccumulation en PCB, HAP et PBDE

Les analyses chimiques effectuées par le CEAEQ chez les deux espèces indiquent que quel que soit le site d'étude, la concentration en PCB bio-accumulés est supérieure chez *Dreissena rostriformis bugensis* comparativement à *Dreissena polymorpha* (Tableau 5.7). Des différences de concentration en HAP sont retrouvées entre les deux espèces, mais la concentration mesurée est plus forte pour une espèce ou l'autre selon le composé considéré ou le site d'étude. Pour les congénères 49 et 99 de PBDE, la concentration bio-accumulée est supérieure chez *D. polymorpha* pour le site de Pointe-des-Cascades alors qu'elle est inférieure comparativement à *D. bugensis* pour les autres sites d'étude (Tableau 5.7). Pour le PBDE 99, une concentration 7 fois plus importante est retrouvée chez *D. bugensis* par rapport à *D.polymorpha* pour le site de Lévis ce qui constitue le plus fort écart observé.

III.2. Identification de l'espèce

Après digestion par l'enzyme de restriction RSA I, deux types de profils de migration sont obtenus. Celui de *Dreissena polymorpha* est composé de deux fragments de restriction, le premier d'environ 470 pb et le second d'environ 230 pb. Pour *Dreissena rostriformis bugensis*, les deux fragments d'ADN observables mesurent environ 530 pb et 170 pb (Figure 5.13). L'identification supposée de l'espèce sur base morphologique était correcte dans 100% des cas pour les sites de Bassin-Louise et Lévis, contrairement au site de Pointe-des-cascades pour lequel le taux d'identification était de 94%.

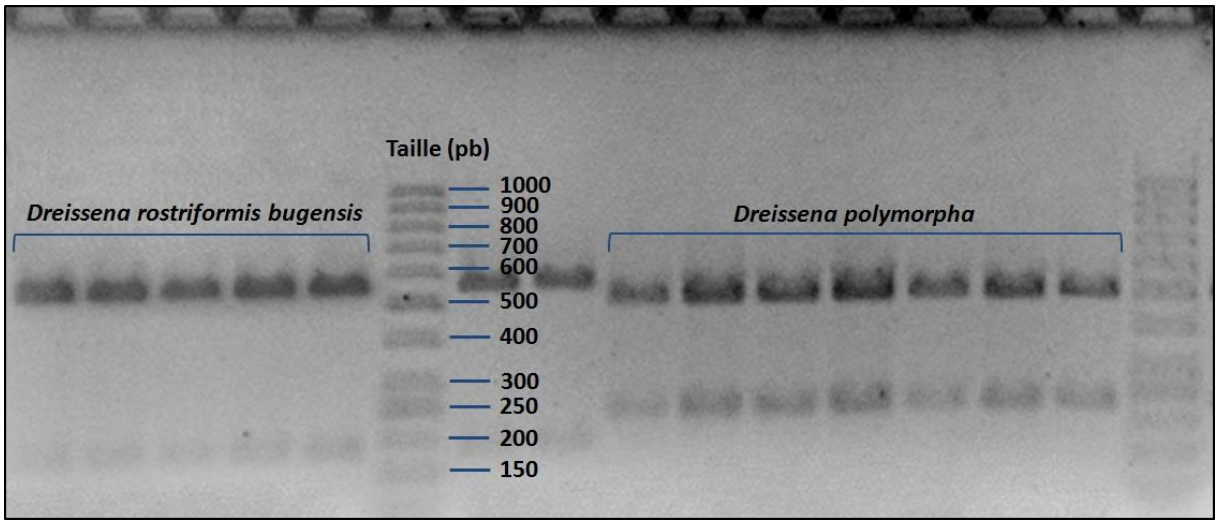


Figure 5. 13 : Fragments de restriction obtenus après digestion par *RSA I* d'une région du gène codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase chez *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis*.

Tableau 5. 7 : Données de contaminations mesurées dans les tissus de *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis* sur les sites échantillonnés. La concentration en contaminant est exprimée en $ng.g^{-1}$ de poids frais.

	Pointe-des-Cascades		**Bassin-Louise**		**Lévis**	
	D. polymorpha	*D. bugensis*	*D. polymorpha*	*D. bugensis*	*D. polymorpha*	*D. bugensis*
PCB 28	0,010	0,012	0,017	0,050	0,020	0,024
PCB 52	0,016	0,027	0,062	0,203	0,017	0,093
PCB 101	0,040	0,070	0,184	0,553	0,042	0,241
PCB 105	0,013	0,019	0,032	0,107	0,012	0,059
PCB 118	0,030	0,062	0,096	0,290	0,026	0,135
PCB 138	0,083	0,161	0,291	0,900	0,068	0,373
PCB 153	0,101	0,195	0,339	1,088	0,073	0,419
PCB 156	0,006	0,011	0,015	0,056	0,004	0,024
PCB 180	0,062	0,139	0,207	0,794	0,056	0,357
PCB 169	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
Naphtalène	1,596	1,343	0,754	0,837	0,541	1,344
Acénaphtylène	0,050	0,030	0,050	0,142	0,100	0,030
Fluorène	0,049	0,058	0,069	0,200	0,100	0,078
Anthracène	0,030	0,040	0,078	0,163	0,100	0,052
Fluoranthène	0,385	0,489	1,421	3,507	0,312	1,098
Pyrène	0,205	0,299	1,271	3,932	0,244	0,998
Benzo(a)anthracène	0,049	0,045	0,368	0,579	0,092	0,230
Chrysène	0,141	0,157	0,040	0,030	0,070	0,020
Benzo(k)fluoranthène	0,060	0,093	0,107	0,367	0,044	0,200
Benzo(a)pyrène	0,040	0,037	0,129	0,367	0,200	0,153
Dibenz(a,h)anthracène	0,500	0,050	0,100	0,060	0,200	0,070
PBDE 47	0,020	0,006	0,129	0,169	0,044	0,137
PBDE 99	0,038	0,016	0,192	0,458	0,070	0,488

III.3. Comparaison des paramètres structuraux hémocytaires

III.3.1. Concentration hémocytaire

La concentration hémocytaire mesurée sur les trois sites est comprise entre 0,8 et 1,22 $x10^6$ cellules.mL^{-1} (Tableau 5.8). Une concentration hémocytaire significativement inférieure est notable chez *Dreissena rostriformis bugensis* pour le site de Lévis comparativement à la seconde espèce.

III.3.2. Distribution hémocytaire

La distribution hémocytaire mesurée sur les sites d'études s'avère être différente entre les deux espèces pour les sites de Pointe-des-Cascades et Bassin-Louise (Tableau 5.8). Pour les deux sites, le taux de hyalinocytes est supérieur chez *D. bugensis* en comparaison avec les taux observés chez *D. polymorpha* (Test t : Pointe-des-Cascades p = 0,041 ; Bassin-Louise p = 0,036). Les moules quagga du site de Pointe-des-Cascades possèdent un taux d'hémocytes blast-like significativement inférieur (Test-T, p = 0,03) et pour celles de Bassin-Louise, le taux de granulocytes est significativement inférieur (Test-T, p = 0,009) comparativement aux moules zébrées.

Tableau 5. 8 : Comparaison des paramètres structuraux et fonctionnels hémolymphatiques mesurés chez *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis*. Les résultats sont exprimés par leur valeur moyenne ± écart type. * *p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001*.

Paramètre	Type cellulaire	**Pointe-des-Cascades**		**Bassin-Louise**		**Lévis**	
		D. polymorpha	*D.r. bugensis*	*D. polymorpha*	*D.r. bugensis*	*D. polymorpha*	*D.r. bugensis*
Concentration hémocytaire ($x10^6$ cellules.mL^{-1})		1,08 ± 0,18	1,22 ± 0,20	1,03 ± 0,14	0,95 ± 0,28	1,18 ± 0,33	0,80 ± 0,33*
Distribution (%)	Hy	33,96 ± 13,62	50,18 ± 16,16 *	39,05 ± 14,13	56,08 ± 18,73*	41,86 ± 19,80	42,16 ± 20,01
	Gr	25,20 ± 5,37	20,64 ± 11,47	32,02 ± 20,20	20,2 ± 7,43**	35,11 ± 11,84	27,26 ± 8,2
	BL	40,85 ± 11,68	29,18 ± 6,27 *	28,94 ± 8,96	23,73 ± 14,92	23,03 ± 15,86	30,58 ± 13,56
Viabilité (%)		76,23 ± 10.69	80,65 ± 7,19	69,39 ± 9,92	77,70 ± 10,47	77,20 ± 13,21	83,71 ± 8,78
Taux de phagocytose (%)	Hy	79,51 ± 4,50	79,8 ± 4,46	67,51 ± 8,32	62,65 ± 4,13	54,22 ± 18,14	46,11 ±14,72
	Gr	29,52 ±12,54	34,87 ± 5,31	33,08 ± 9,62	28,35 ± 7,75	23,86 ± 7,54	19,89 ± 9,86
Nombre moyen de billes	Hy	46,81 ± 19,32	51,04 ±14,52	50 ± 13,42	46,39 ± 19,43	36,70 ±22,12	33,74 ±16,01
	Gr	9,87 ± 17,95	17,95 ± 5,27 **	38,23 ± 8,28	39,97 ± 19,29	23,71 ± 12,15	23,20 ± 11,07
Activité oxydative (U.A.)	Hy	2005,1 ± 993,4	5226,5 ± 1859,8 ***	1122,2 ± 424,8	4154,2 ± 1972,7***	431,6 ± 334,8	759,3 ± 656,8
	Gr	1347,9 ± 911,8	2815,8 ± 1865,8	844,2 ± 497,8	2003,7 ± 1240 *	284,6 ± 159,3	546,2 ± 386,5
	BL	20,9 ± 23,3	81,8 ± 54,1 *	14,2 ± 4,3	60,6 ± 40,1 **	22,9 ± 6,3	79,1 ± 180,9
Contenu en lysosomes (U.A.)	Hy	67,18 ± 49,02	82,65 ± 33,25	44,39 ± 10,57	46,96 ± 10,89	122,39 ± 70,47	94,65 ± 37,65
	Gr	150,27 ± 59,93	202,97 ± 105,59	106,09 ± 39,73	96,53 ± 33,09	173,22 ± 91,51	114,49 ± 54,73
	BL	17,77 ± 2,12	50,77 ± 4,51	20,13 ± 1,13	18,74 ± 4,14	16,13 ± 3,69	16,48 ± 5,10
Activité mitochondriale (U.A.)	Hy	73,65 ± 30,39	64,41 ± 32,13	14,73 ±4,78	21,28 ± 7,59 *	33,09 ±15,54	28,65 ± 12,74
	Gr	168,7 ± 53,81	158,93 ± 44	58,76 ± 12,20	72,86 ± 21,53	79,08 ± 16,80	75,1 ± 28,93
	BL	38,8 ± 7,32	37,23 ± 7,75	2,63 ± 3,7	27,31 ± 7,2	25,8 ± 4,88	20,46 ± 3,74

III.3.3. Viabilité cellulaire

La viabilité hémocytaire moyenne mesurée lors de cette expérimentation est de 77,4 ± 10,6% et pour chaque site, les deux espèces présentent des taux de viabilité similaires (Tableau 5.8).

III.4. Comparaison des paramètres fonctionnels hémocytaires

III.4.1. Activité de phagocytose

Les mesures des marqueurs phagocytaires indiquent que le taux de phagocytose n'est pas significativement différent entre les deux espèces quel que soit le site considéré. Pour le nombre moyen de billes phagocytées, une valeur significativement supérieure (Test-T, p = 0,002) a été mesurée pour les granulocytes des moules quagga du site de Pointe-des-Cascades (Tableau 5.8).

III.4.2. Activité oxydative hémocytaire

L'utilisation du DCFH-DA pour mesurer l'activité oxydative hémocytaire ne révèle pas de différence d'activité entre les deux espèces prélevées sur le site de Lévis (Tableau 5.8). Pour les moules issues des sites de Pointe-des-Cascades et de Bassin-Louise, des différences très hautement significatives d'activités des hyalinocytes sont mesurables entre les deux espèces (p = 0,001). Cette différence d'activité est également observable entre les deux autres types cellulaires pour les moules prélevées à Bassin-Louise, alors que pour celles de Pointe-des-Cascades, l'activité des granulocytes n'est pas significativement différente entre les deux espèces (p = 0,055) (Figure 5.14).

III.4.3. Contenu en lysosomes

Les mesures du contenu en lysosomes hémocytaires indiquent qu'aucune différence significative n'est observable entre les deux espèces quel que soit le type cellulaire considéré et le site de prélèvement (Tableau 5.8).

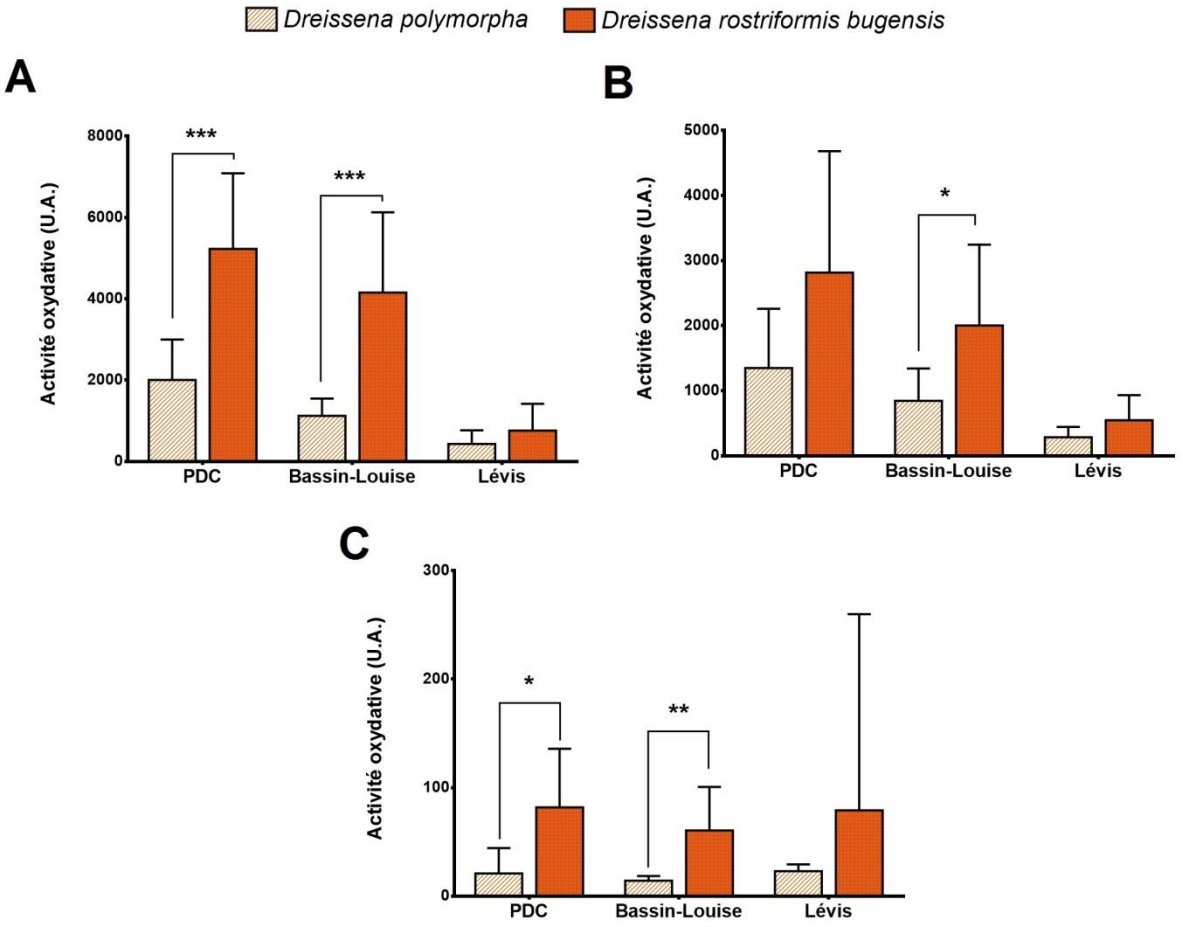


Figure 5. 14 : Activité oxydative hémocytaire des hyalinocytes (A), Granulocytes (B) et blast-like (C) mesurées chez *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis*. Les résultats sont présentés en unité arbitraire de fluorescence ± écart type. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

III.4.4. Activité mitochondriale

L'activité mitochondriale hémocytaire des deux espèces est semblable pour les trois types cellulaires des individus prélevés sur les sites de Pointe-des-Cascades et Lévis.

Pour les moules de Bassin-Louise, seule l'activité mitochondriale des hyalinocytes est significativement inférieure chez *D. polymorpha* par rapport à *D. bugensis* (Test-t, p = 0,038 ; Tableau 5.8).

III.5. Comparaison de la sensibilité hémocytaire au cadmium

L'exposition des cellules hémocytaires à une concentration croissante en cadmium génère une diminution de la viabilité cellulaire de façon dose-dépendante permettant de calculer une valeur de CE_{50} pour ce paramètre. Les CE_{50} calculées chez les deux espèces pour les trois sites sont comprises entre 5,3 et 2,2 $.10^{-3}$ M. La sensibilité de ce paramètre ne présente aucune différence significative entre les deux espèces sur les trois sites d'étude (Pointe-des-Cascades : p = 0,487 ; Bassin-Louise : p = 0,261 ; Lévis : p = 0,125) (Figure 5.15).

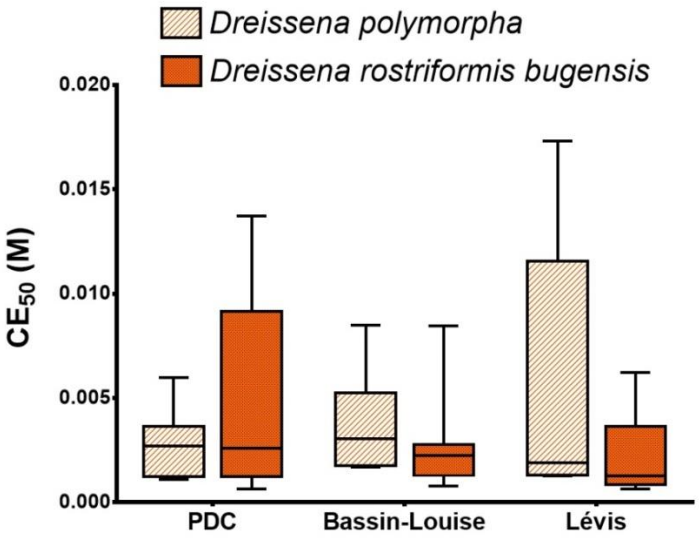


Figure 5. 15 : CE_{50} calculée pour la viabilité hémocytaire après 21 heures d'exposition au cadmium chez *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis*.

IV. Discussion

Ces travaux constituent la première étude visant à comparer les réponses hémocytaires chez les deux espèces sympatriques de dreissène, *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis*. Dans un contexte de biosurveillance environnementale, peu d'études se sont intéressées à comparer les réponses de deux espèces proches

pouvant être échantillonnées sur un même site de façon involontaire. Chez les dreissènes, ce problème est important de par les différences morphologiques entre les deux espèces pouvant être discrètes pour certaines populations. Bien que dans notre étude, l'identification de l'espèce sur des critères morphologiques soit proche de 100% de réussite, les travaux menés par Beggel *et al.*, 2015 font état d'un pourcentage d'erreur supérieur à 17% en utilisant cette méthode. Par conséquent, si les réponses mesurées varient entre les deux espèces, une simple différence dans l'effort d'échantillonnage ou de proportion des deux dreissénidés entre les sites d'étude peut générer un biais dans l'analyse des résultats et conduire à des interprétations erronées. Ainsi, identifier si l'espèce constitue un facteur confondant pour des études écotoxicologiques est un point d'intérêt majeur pour améliorer la pertinence des données.

D'après les données de la littérature, la possibilité d'une fécondation croisée entre les deux espèces a été mise en évidence lors d'expérimentations en laboratoire sans pour autant réussir à aboutir au développement des larves issues de ces manipulations (Nichols & Black 1994). Cependant, l'hybridation entre les deux espèces n'a pas été observée *in situ*. Ainsi, Spidle *et al.*, 1995b n'ont détecté aucun hybride sur 750 individus analysés provenant d'un site où cohabitent les deux espèces. Seuls les travaux de Voroshilova *et al.*, 2010 indiquent avoir détecté un individu hybride parmi leurs 37 individus échantillonnés. Dans l'environnement, bien que les périodes de ponte se superposent entre les deux espèces, il est possible que d'autres mécanismes empêchent l'hybridation interspécifique (Spidle *et al.*, 1995b). Par conséquent, la présence d'hybrides dans les échantillons ne constitue pas une préoccupation importante pour les études de surveillance environnementale.

L'étude des paramètres hémocytaires structuraux indique la présence de différences significatives entre les deux espèces selon les sites. Pour la concentration hémocytaire, seul le site de Lévis indique une concentration cellulaire supérieure pour *D. polymorpha* alors qu'aucune différence de distribution hémocytaire n'est notable. Ceci suggère que pour ce site, les taux d'infiltrations hémocytaires chez *D. bugensis* sont plus importants, ce qui aboutit à une concentration en cellules circulantes inférieure à D. polymorpha

(Pipe & Coles 1995). Une autre hypothèse pourrait être liée au fait que les moules quagga utilisées sont de taille supérieure aux *D. polymorpha*. Ceci pourrait entraîner le prélèvement d'eau intervalvaire en plus grande quantité lors de la ponction d'hémolymphe et diluerait l'échantillon. Le second paramètre structural présentant des différences significatives entre les deux espèces concerne la distribution hémocytaire. Ces différences n'étant pas présentes sur tous les sites, elles peuvent indiquer une dynamique hémocytaire différente entre les deux espèces en réponse à différents paramètres du milieu mais nos résultats ne permettent pas de connaître les mécanismes précis associés à ces différences.

Concernant l'étude des fonctionnalités hémocytaires, nous observons un nombre moyen de billes phagocytées supérieur chez *D. bugensis* pour le site de Pointe-des-Cascades ainsi qu'une activité oxydative supérieure chez cette même espèce comparativement à *D. polymorpha* sur le site de Pointe-des-Cascades et Bassin-Louise. Des résultats proches ont été observés dans les travaux de Luengen *et al.*, 2004 qui ont mis en évidence lors d'une étude écotoxicologique, des différences d'activité de phagocytose entre *Mytilus californianus* et des hybrides de *Mytilus galloprovincialis / trossulus* sur des sites contaminés. Les auteurs établissent un lien entre les taux de phagocytose et les niveaux d'accumulation des contaminants qui s'avèrent être différents entre les deux espèces. Cette hypothèse est également possible dans le cas de notre étude étant donné les différences de capacité de bioaccumulation des deux espèces et pourrait expliquer les différences d'activités oxydatives mesurées (Roseman *et al.*, 1994 ; Richman & Somers 2005 ; Schäfer *et al.*, 2012). Cependant, cet effet n'est pas marqué sur les trois sites d'étude et d'autres mécanismes pourraient être mis en jeux pour expliquer ces effets. Une étude menée chez deux gastéropodes partageant le même habitat (*Haliotis discus discus* et *Turbo cornutus*) indique que l'activité oxydative hémocytaire basale est similaire entre les deux espèces mais des différences de réponses apparaissent en présence d'un agent stimulant (Donaghy *et al.*, 2010). Les auteurs émettent l'hypothèse que ces réponses sont liées à des capacités de régulations de l'activité oxydative différentes entre les deux espèces, ce qui pourrait également être le cas dans notre étude. L'analyse de l'expression et des activités enzymatiques anti-oxydantes des hémocytes pourrait apporter des informations

complémentaires pour confirmer ces hypothèses. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que ces différences d'activité oxydative puissent être liées à une différence de capacité de production de ROS ou RNS entre les deux espèces.

Lors de notre étude, les résultats obtenus pour les valeurs de CE_{50} sur la viabilité hémocytaire suite à l'exposition *ex vivo* des cellules au cadmium n'indiquent pas de différence entre les deux espèces quel que soit le site d'étude considéré. D'après les résultats obtenus dans l'article n°2 de ce manuscrit, la viabilité ne constitue pas le marqueur le plus sensible face à la toxicité du cadmium et nous ne pouvons pas extrapoler ces résultats sur les effets induits sur d'autres marqueurs comme la phagocytose par exemple. Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour vérifier cette hypothèse. Néanmoins, il a été démontré chez deux espèces de mytilidés vivant en sympatrie sur les îles Kerguelen une différence de sensibilité au cadmium des hémocytes. Bien que, suite à l'expositions *ex vivo* des hémocytes au cadmium, la viabilité cellulaire était affectée de façon semblable chez les deux espèces, les niveaux d'apoptose étaient plus élevés pour l'une des deux espèces (Caza *et al.*, 2015). Les auteurs émettent l'hypothèse d'une différence des systèmes MXR qui pourrait engendrer des réponses contrastées entre ces deux espèces génétiquement proches. Les résultats de nos travaux ne permettent pas d'exclure que la sensibilité des deux espèces aux contaminants soit différente dans le milieu naturel. En effet, la capacité de filtration supérieure de *D. bugensis* par rapport à *D.polymorpha* constitue un facteur biologique clef pouvant être à l'origine de variabilités des réponses mesurées entre les deux espèces dans un contexte de contamination environnementale. Des différences de bioaccumulation des polluants ont été décrites dans la littérature (Johns & Timmerman 1998; Rutzke *et al.*, 2000 ; Richman & Somers 2005 ; Schäfer *et al.*, 2012). Dans notre étude, les mesures de bioaccumulation des contaminants organiques réalisées par le CEAEQ viennent conforter ces observations et indiquent que la différence d'accumulation entre les deux espèces peut varier jusqu'à un facteur 7 dans le cas du PBDE 99. Ainsi, ces différences de bioaccumulation peuvent résulter en des effets toxiques non similaires sur une même fonction physiologique chez les deux espèces. C'est le cas notamment dans les travaux de Schäfer *et al.*, 2012 qui mesurent une accumulation plus forte des contaminants chez *D. bugensis* et observent en parallèle

des effets génotoxiques plus importants. Bien que dans notre étude, les différences d'activités hémocytaires soient apparues principalement sur le niveau d'activité oxydative, des différences plus tranchées pourraient apparaître sur d'autres sites ou dans d'autres contextes de contaminations.

V. Conclusion

Cette étude comparative des paramètres hémocytaires entre *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis* souligne des différences de réponses entre les deux espèces ce qui implique une vigilance particulière quant à leur utilisation sans distinction. Lors d'études *in situ* réalisées sur plusieurs stations, il serait judicieux de sélectionner une espèce sur les deux pour réaliser les analyses biologiques ou les mesures d'accumulation des contaminants. Pour les études en milieu naturel, la mise en place d'un biomonitoring actif par encagement d'une des deux espèces pourrait constituer une alternative permettant d'éviter les biais d'échantillonnage et d'analyse.

Chapitre 6 : Synthèse générale et perspectives

I. Synthèse générale

L'extension des activités humaines est responsable à l'échelle globale du rejet de molécules pouvant affecter la physiologie des organismes peuplant les écosystèmes et notamment dans les milieux aquatiques qui constituent le réceptacle final d'une grande part des polluants. Afin d'estimer l'impact des polluants sur les écosystèmes aquatiques, certaines des recherches en écotoxicologie s'orientent vers le développement d'outils précoces d'évaluation des effets éco-toxiques. Ces biomarqueurs doivent permettre d'évaluer de façon prédictive, les conséquences de l'exposition des organismes sur les populations auxquelles ils sont associés. Les biomarqueurs sont recherchés au niveau infra-individuel, c'est-à-dire au plus près de l'action potentielle des xénobiotiques dans l'organisme. Ils doivent permettre d'estimer l'état de fonctionnement des systèmes physiologiques de l'organisme exposés aux agents toxiques. C'est ainsi que sont analysées dans le cadre d'approches *in vivo* ou *in situ*, les fonctions liées à la reproduction, au métabolisme énergétique et à la défense des organismes.

La biosurveillance écotoxicologique requiert des techniques et méthodologies fiables et simplifiées afin de pouvoir à terme être utilisées dans des programmes de suivis de la qualité des masses d'eau. L'ensemble associant le modèle « dreissène » et les analyses de biomarqueurs hémocytaires, constitue une association novatrice pour l'évaluation des risques écotoxiques au sein des masses d'eau continentale. De par leurs fonctionnalités multiples et leurs implications dans les grandes fonctions physiologiques chez les mollusques et notamment dans les réponses immunitaires, les hémocytes constituent un modèle cellulaire d'intérêt pour étudier l'état de santé des individus. Un simple prélèvement d'hémolymphe permet l'analyse, au niveau individuel, de marqueurs structuraux ainsi que de cinq marqueurs de fonctionnalité des hémocytes (viabilité, phagocytose, activités oxydative et mitochondriales, contenu en lysosomes). Les réponses de ces marqueurs qui révèlent l'état du fonctionnement hémocytaire, sont au cœur de la physiologie générale du mollusque et leur modulation par les xénobiotiques conduit à des conséquences sur la reproduction, la défense et l'énergétique de l'organisme.

La forte capacité d'intégration par les bivalves de l'état chimique de leurs milieux de vie positionne le modèle dreissène au cœur des approches de biosurveillance de la qualité des masses d'eaux continentales. Si l'utilisation des bivalves dans les programmes de biosurveillance des eaux littorales est adoptée depuis de nombreuses années, le couple dreissène-hémocytes doit parvenir à combler un manque d'outils pour la surveillance biologique des eaux douces.

Notre travail a mis en avant une approche multi-marqueurs supportée par les cellules hémocytaires. Elle a été permise par l'usage de la technique de cytométrie en flux. Grâce à ces nombreuses données acquises rapidement à partir d'un même échantillon, nous avons pu nous rendre compte que parmi les marqueurs étudiés, tous n'ont pas les mêmes réponses face à l'exposition de l'organisme à la contamination du milieu.

Il ressort un positionnement fort de la phagocytose, qui s'est avérée être le marqueur le plus sensible parmi les cinq marqueurs fonctionnels mesurés suite à l'exposition *ex vivo* des cellules hémocytaires au cadmium. Il pourrait d'ailleurs être particulièrement intéressant de coupler l'usage de ce marqueur avec la démarche de « *stress on stress* » appliquée dans nos différentes études. L'apport de cette démarche dans un contexte *ex vivo* a montré sa capacité à discriminer les sites les plus contaminés ou de conditions environnementales générant un stress chez les individus. L'association entre la démarche *ex vivo* de *stress on stress* avec le test de phagocytose hémocytaire devrait accroître la significativité des résultats obtenus. Une telle démarche est originale en regard de la littérature dans le domaine. En effet, l'utilisation de tests *ex vivo* hémocytaires et les démarches de stress on stress sont généralement utilisés séparément. D'une part, des études ont utilisé l'exposition des hémocytes *ex vivo* à diverses classes de polluants pour déterminer la toxicité sur les fonctionnalités hémocytaires et notamment sur la phagocytose (Galloway & Depledge 2001 ; Girón-Pérez 2010 ; Renault 2015). D'autre part, l'utilisation de la démarche « stress on stress » est généralement réalisée par la mesure du temps de survie à l'air des mollusques à l'issue d'une première exposition à un stress environnemental. Cette méthode a été utilisée dans divers contextes, aussi bien *in vivo* qu'*in situ* et apparait comme étant un indicateur simple de l'état de santé des individus (Veldhuizen-Tsoerkan

et al., 1991 ; Viarengo *et al.*, 1995 ; Zwaan *et al.*, 1996 ; Hellou & Law 2003 ; Monari *et al.*, 2007). Ainsi, l'utilisation de l'exposition *ex vivo* en tant que second stress permet de tirer les avantages des deux méthodes en étudiant les modulations des effets toxiques générées par un premier stress pouvant être d'origines diverses.

Malgré tout, la validité optimale des résultats acquis par cette démarche passe par une amélioration de la caractérisation du biomarqueur « phagocytose ». Nos travaux sur ce point, présentés dans le chapitre 2, ont déjà permis de mieux cerner les facteurs de confusion à prendre en considération pour s'assurer de la validité des mesures de cette activité phagocytaire. Il paraît désormais important de parvenir à une harmonisation de la méthode d'analyse. Cette démarche est particulièrement importante dans le cas d'études écotoxicologiques basées sur l'utilisation à large échelle du modèle dreissène-hémocytes, dans le cas de comparaisons multi-sites.

Pour les autres fonctions mesurées, les réponses obtenues dans le contexte *ex vivo* indiquent une sensibilité moindre de ces biomarqueurs comparativement à la mesure d'activité de phagocytose. Cependant, bien que les réponses mesurées sur ces fonctions dans les différentes approches expérimentales mises en place lors de nos études semblent donner des résultats moins probants, il est important d'enrichir les données et d'élargir les contextes d'études utilisant ces marqueurs afin de mieux définir les limites de leur utilisation.

Si les données que nous avons obtenues nous permettent de mettre en avant l'utilisation du biomarqueur phagocytose vis-à-vis notamment de sa sensibilité au stress chimique, il n'en demeure pas moins que cette vision est fortement dépendante des protocoles et méthodologies expérimentales que nous avons mis en œuvre. Ainsi, les premières perspectives et développements de notre travail seront liés à la nécessité de vérifier les réponses observées sur le long terme et de manière répétée. C'est grâce à de longs temps d'observation que les utilisations des modèles bivalves pour la surveillance des zones littorales ont pu être validées. Les études menées sur notre modèle d'eau douce n'en sont qu'à leur début et la validation de nos biomarqueurs hémocytaires passe par l'établissement de longues séquences sur des zones atelier à définir (Saint-Laurent, Seine, Meuse…).

L'utilisation des réponses hémocytaires chez la moule zébrée passe par l'identification des sous-populations présentes dans l'hémolymphe. Les travaux de Giamberini *et al.*, 1996 ont décrit la présence de trois types hémocytaires chez *Dreissena polymorpha* en se basant sur des critères morphologiques et histochimiques : des hyalinocytes, des granulocytes neutrophiles et des grands hémocytes basophiles (LBH : « Large Basophilic hemocyte »). Nous avons pu nous aussi observer trois types hémocytaires avec quelques différences en terme de colorations intra-cytoplasmiques. Dans la littérature, le seul consensus réel existant autour de l'identification des types hémocytaire réside dans la séparation entre les hémocytes granulaires et agranulaires. Pour la dénomination de sous-populations particulières au sein de ces deux catégories, il n'y a cependant pas de nomenclature précise et les appellations divergent entre les études.

Des travaux mettent en évidence que la forte plasticité des hémocytes entraîne des changements rapides de morphologie cellulaire et que le critère de taille peut donc être variable dans le temps. Ceci indique que l'utilisation de plusieurs critères est indispensable (histologie, histochimie, cytométrie, mesures de motilité). La cytométrie permet de différencier des sous-populations cellulaires mais il faut garder en tête les limites techniques de cette approche afin d'éviter les mauvaises interprétations de résultats.

Grâce à l'utilisation d'un trieur de cellules, nous avons pu établir les correspondances entre les types cellulaires observés en microscopie optique et les populations analysées en cytométrie. L'utilisation de sondes fluorescentes nous a permis de quantifier des niveaux d'activité de base (phagocytose, activité oxydative, contenu en lysosomes et activité mitochondriale) pour chaque type cellulaire. Cette étude a été réalisée lors de la période de gamétogenèse et en période de ponte ce qui correspond à deux périodes contrastées d'un point de vue physiologique chez la dreissène. Les résultats indiquent que les cellules blast-like possèdent des niveaux d'activité faibles quels que soient la période et le marqueur considérés. Ce type cellulaire est décrit dans plusieurs études chez d'autres espèces de mollusques et présente les caractéristiques de cellules immatures qui pourraient être précurseurs des autres types observés bien que les

mécanismes sous-jacents soient toujours inconnus (Cima *et al.*, 2000; Matozzo *et al.*, 2008). Pour les deux autres types cellulaires, on observe qu'en période de gamétogenèse les hyalinocytes possèdent la plus forte activité oxydative alors que les granulocytes présentent un système lysosomal plus développé et une activité mitochondriale supérieure. Des analyses en microscopie ont également permis d'observer une importante capacité de phagocytose par les hyalinocytes. Ces résultats indiquent que les granulocytes et les hyalinocytes constituent les deux types cellulaires actifs, équipés pour réaliser l'action de phagocytose et de dégradation des particules ingérées. D'après les données de la littérature, certaines études observent que les types hémocytaires présentent une capacité de phagocytose différente selon le type de particule ingérées (Hine & Wesney 1994; Takahashi & Mori 2000; Terahara *et al.*, 2006). Les différents niveaux d'activité oxydative mesurés dans notre étude suggèrent également que ces deux types cellulaires possèdent des voies de dégradation différentes.

Parmi les facteurs qui influencent les activités hémocytaires, deux sont à mettre en avant :

- 1 : L'influence de la saison de prélèvement en lien avec la période de ponte

Au moment de la ponte on note une augmentation de la proportion en hyalinocytes au détriment des deux autres types cellulaires et d'un point de vue fonctionnel les niveaux d'activité de phagocytose, d'activité oxydative et mitochondriales chutent de façon importante. A contrario pour le contenu en lysosomes, le niveau mesuré est significativement supérieur et atteint des valeurs plus importantes pour les hyalinocytes comparativement aux granulocytes. Ceci souligne le lien fort existant entre le statut physiologique des organismes et les activités hémocytaires. Les plus faibles niveaux d'activités cellulaires observés dans notre étude correspondent à la période où les réserves énergétiques sont au plus bas chez la dreissène (Palais *et al.*, 2011). Nous pouvons ainsi supposer que l'énergie allouée à la ponte ne permet pas le maintien optimal des activités hémocytaires ce qui peut constituer une période critique de susceptibilité des dreissènes face à des pathogènes.

- 2 : La prise en compte de l'espèce de dreissène

La moule zébrée, *Dreissena polymorpha* et la moule dite quagga *Dreissena rostriformis bugensis* sont deux espèces proches de dreissénidés vivant en sympatrie. Dans l'environnement, elles sont en compétition mais les différences biologiques et écologiques observables entre les deux espèces privilégient *Dreissena bugensis* pour l'acquisition de l'espace et des ressources (Baldwin *et al.*, 2002 ; Wilson *et al.*, 2006 ; Karatayev *et al.*, 2014b). Lors de nos expérimentations, nous avons pu détecter des différences de bioaccumulation des contaminants organiques ainsi que des différences significatives pour les paramètres structuraux hémocytaires mais aussi pour les réponses fonctionnelles hémocytaires entre ces deux espèces, notamment pour l'activité oxydative qui est significativement supérieure chez *Dreissena bugensis*. Concernant la sensibilité des deux espèces aux contaminants, nous n'avons pas observé de différences d'effets du cadmium sur la viabilité cellulaire lors d'expositions *in vitro*. Cependant, les corrélations calculées à partir des données de bioaccumulation mesurées pour chaque site indiquent que les paramètres hémocytaires des deux espèces vont répondre différemment à la présence de contaminants dans l'environnement.

Cette étude indique que la mesure des marqueurs hémocytaires sans distinction d'espèce peut conduire à des biais dans les résultats, notamment pour l'activité oxydative, du simple fait d'une proportion différente entre les deux espèces entre les sites d'étude. Il est donc important de prendre en considération ce paramètre lors des expérimentations. De plus, du fait que les deux espèces semblent répondre différemment à la contamination environnementale, il est probable que des divergences plus fortes soient marquées dans d'autres contextes expérimentaux. Pour les travaux menés au Québec, que ce soit pour les expérimentations en milieu contrôlé ou *in situ*, il n'a pas été possible d'identifier avec certitude l'espèce échantillonnée. De ce fait, nous pouvons supposer que la forte variabilité de réponse observée pour l'activité oxydative hémocytaire provienne de la présence des deux espèces dans nos échantillons. Il est donc possible que certains effets n'aient pas pu être observés du fait de cette variabilité apparente.

Outre les perspectives d'utilisation des outils développés en biosurveillance du milieu, les expérimentations inhérentes au programme de recherche ANR-CRSNG IPOC associées à cette thèse ont permis d'étudier l'influence du statut physiologique de l'individu et de facteurs environnementaux sur la physiologie hémocytaire. Ces travaux reflètent les capacités adaptatives de cette espèce invasive et devraient tendre à constituer un ensemble de données préliminaires dont la portée est d'être utilisées dans des contextes multiples aussi bien en écotoxicologie qu'en écophysiologie de l'invasion afin d'améliorer le contrôle de cette espèce dans les zones où sa présence est problématique.

II. Perspectives

Le programme IPOC dans lequel se sont insérés nos travaux expérimentaux a permis l'acquisition de données de façon pluri-saisonnières sur près de trois années. Nous disposons ainsi d'une base de données conséquente de cytogrammes de distributions hémocytaires qu'il serait intéressant d'analyser en terme de proportion des sous populations que nous avons déterminé par nos travaux (hyalinocytes, granulocytes et blastes). Ainsi, au-delà des différences méthodologiques liées aux analyses fonctionnelles sur hémocytes qui ont pu présenter quelques variantes de protocoles, les enregistrements de cytogrammes doivent pouvoir constituer une base de données exploitable.

Les expérimentations *ex vivo* réalisées dans ces travaux de thèse permettent de valider l'utilisation des marqueurs développés mais également la démarche expérimentale entreprise pour tester les effets toxiques de molécules au travers d'expositions aiguës. Dans l'étude de Quinn *et al.*, 2009, le milieu de culture développé permet le maintien des hémocytes de dreissène sur une durée de 14 jours. Cette méthode a été utilisée afin d'exposer pendant 96 heures des hémocytes à des résidus pharmaceutiques avant de mesurer la viabilité des cellules (Parolini *et al.*, 2011b). Il serait intéressant d'étendre l'utilisation de nos marqueurs hémocytaires à cette approche qui permettrait d'avoir deux modalités d'expositions pour notre modèle cellulaire, un test d'exposition aiguë et

un second se rapprochant d'une exposition chronique afin de réaliser des expositions à des concentrations en contaminants plus réalistes d'un point de vue environnemental.

L'approche *in vivo* permettant d'étudier les effets des paramètres physico-chimiques sur les activités hémocytaires de la dreissène révèle que cette espèce possède une forte capacité d'acclimatation lui permettant de maintenir ses activités hémocytaires sur une large gamme de conditions environnementales. Cependant, il semblerait que ces mécanismes aient un coût énergétique affectant la tolérance de l'espèce aux contaminants. Suite aux expérimentations menées, il serait intéressant de pouvoir évaluer les effets croisés des changements de température et de pH afin d'évaluer si des effets synergiques sur la physiologie hémocytaire ce qui pourrait augmenter significativement la sensibilité de l'espèce à la présence de contaminants dans le milieu. Après avoir testé l'effet de la température sur la tolérance de l'espèce aux contaminants, il serait intéressant de voir si l'exposition aux polluants module les réponses de l'espèce à un stress de température.

Les analyses réalisées chez *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis* révèlent que ces deux espèces présentent des différences notables au niveau de leurs activités hémocytaires et il serait donc intéressant de poursuivre les recherches sur cette thématique. En effet, bien que les populations de moules zébrées soient établies dans de nombreux écosystèmes européens, la moule quagga peut la remplacer rapidement. De ce fait, disposer de données comparatives entre les deux espèces permettrait de maintenir des activités de biosurveillance en continu quelle que soit l'espèce présente tout en évitant les erreurs d'interprétation dans le cas où une espèce remplace l'autre. La multiplication des expérimentations *in situ* devrait permettre l'acquisition de données supplémentaires permettant de renforcer les connaissances autour des effets des polluants sur les paramètres hémocytaires des dreissénidés. Ces expérimentations pourront être menées aussi bien lors de biosurveillance active que passive.

Ces travaux de thèse apportent des informations conséquentes sur l'influence de différents paramètres aussi bien intrinsèques qu'extrinsèques sur les modulations des niveaux d'activité de base des cellules hémocytaires. Il serait important pour des

prochaines études d'appréhender si les modulations observées ont des répercussions sur la capacité de réponse des hémocytes en présence de pathogène. Chez la dreissène, la bactérie *Pseudomonas fluorescens* constitue un pathogène connu qui est utilisé comme biocide pour éliminer les dreissénidés (Molloy *et al.*, 2013a, 2013b ; Meehan *et al.*, 2014). Cette souche semble donc être un très bon candidat pour étudier les interactions hôte-pathogène chez notre modèle biologique.

Les résultats obtenus lors des expérimentations *in situ* soulignent la complexité des interactions présentes entre les fonctionnalités hémocytaires et le statut physiologique de l'individu, lui-même influencé par les paramètres environnementaux. Le statut reproducteur et les réponses hémocytaires sont physiologiquement intimement liés. La maturation de la gonade est induite de façon concomitante à l'acquisition d'énergie et sont eux-mêmes dépendants des conditions environnementales (température et disponibilité en nourriture). De ce fait, il serait extrêmement intéressant d'étudier plus finement les liens existants entre reproduction, énergie et fonctions hémocytaires au travers d'un suivi plus régulier, ce qui permettrait de déterminer les fluctuations naturelles, physiologiques des niveaux de réponse des biomarqueurs. Ces fonctions physiologiques peuvent également être modulées par l'action néfaste des polluants ce qui complexifie encore l'étude de ces interactions. Etant donnés les liens étroits et indissociables qui apparaissent entre les paramètres biologiques, écologiques et physiologiques, il semble indispensable d'intégrer l'étude des fonctionnalités hémocytaires au travers d'approches éco-immunotoxicologiques.

Références bibliographiques

Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. J. Exp. Biol. 205, 1831–1841. doi:10.1016/j.ecolind.2011.04.007

Accorsi, A., Bucci, L., de Eguileor, M., Ottaviani, E., Malagoli, D., 2013. Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. Fish Shellfish Immunol. 34, 1260–8. doi:10.1016/j.fsi.2013.02.008

Ackerman, J., Sim, B., Nichols, J., Claudi, R., 1994. A review of the early life history of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): comparisons with marine bivalves. Can. J. Zool. 72, 1169–1179.

Ackerman, J.D., 1999. Effect of velocity on the filter feeding of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for trophic dynamics. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56, 1551–1561. doi:10.1139/cjfas-56-9-1551

Aladaileh, S., Nair, S. V, Birch, D., Raftos, D. A, 2007. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. J. Invertebr. Pathol. 96, 48–63. doi:10.1016/j.jip.2007.02.011

Alcaraz, C., Caiola, N., Ibáñez, C., 2011. Bioaccumulation of pollutants in the zebra mussel from hazardous industrial waste and evaluation of spatial distribution using GAMs. Sci. Total Environ. 409, 898–904. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.11.015

Allam, B., Ashton-Alcox, K. A., Ford, S.E., 2002. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. Fish Shellfish Immunol. 13, 141–158. doi:10.1006/fsim.2001.0389

Allam, B., Paillard, C., 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. Dis. Aquat. Organ. 33, 123–128. doi:10.3354/dao033123

Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 2000. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen Vibrio tapetis. J. Invertebr. Pathol. 76, 63–9. doi:10.1006/jipa.2000.4940

Allam, B., Ashton-Alcox, K.A., Ford, S.E., 2002b. Flow cytometric measurement of hemocytes viability and phagocytic activity in the clam *Ruditapes philippinarum*. J. Shellfish Res.

Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., Ford, S.E., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following in vivo challenge. Fish Shellfish Immunol. 20, 384–397. doi:10.1016/j.fsi.2005.05.013

Allam, B., Raftos, D., 2015. Immune responses to infectious diseases in bivalves. J. Invertebr. Pathol. 131, 121–136. doi:10.1016/j.jip.2015.05.005

Alvarez, M.R., Friedl, F.E., Johnson, J.S., Hinsch, G.W., 1989. Factors affecting *in vitro* phagocytosis by oyster hemocytes. J. Invertebr. Pathol. 54, 233–241. doi:10.1016/0022-2011(89)90033-5

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D. A, 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1919–25.

Anderson, R.S., 2001. Reactive oxygen species and antimicrobial defenses of invertebrates: A bivalve model. Adv. Exp. Med. Biol. 484, 131–139.

Anderson, R.S., Oliver, L.M., Dan, J., 1992. Immunotoxicity of cadmium for the eastern oyster (*Crassostrea virginica* [Gmelin, 1971]): effects on hemocyte chemioluminescence. J. Shellfish Res. 11, 31–35.

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.

Arumugam, M., Romestand, B., Torreilles, J., Roch, P., 2000. In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by Mytilus galloprovincialis haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. Eur. J. Cell Biol. 79, 513–519. doi:10.1078/0171-9335-00068

Ashton-Alcox, K. A., Ford, S.E., 1998. Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. Tissue Cell 30, 195–204.

Astuya, A., Carrera, C., Ulloa, V., Aballay, A., Núñez-Acuña, G., Hégaret, H., Gallardo-Escárate, C., 2015. Saxitoxin modulates immunological parameters and gene transcription in *Mytilus chilensis* hemocytes. Int. J. Mol. Sci. 16, 15235–15250. doi:10.3390/ijms160715235

Auclair, M.J., 1995. Bilan régional - Secteur Montréal-Longueuil. Environnement Canada - région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent. Rapport Zone d'intervention prioritaire 9. 66 pages.

Auffret, M., 1988. Bivalve hemocyte morphology. Am. Fish. Soc. Spec. Pub. 18, 169-177.

Auffret, M., 2005. Bivalves as Models for Marine Immunotoxicology, in: Investigative Immunotoxicology. Informa Healthcare, pp. 29–48. doi:10.1201/9781420036817.ch3

Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D., 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Mar. Environ. Res. 54, 585–589. doi:10.1016/S0141-1136(02)00120-4

Auffret, M., Oubella, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *In vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol. 118, 705–712. doi:10.1016/S0300-9629(97)00017-0

Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Le Floch, S., Renault, T., 2008. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Toxicol. In Vitro 22, 1610–7. doi:10.1016/j.tiv.2008.04.011

Baines, S.B., Fisher, N.S., Kinney, E.L., 2005. Influence of temperature on dietary metal uptake in Arctic and temperate mussels. Mar. Ecol. Prog. Ser. 289, 201–213. doi:10.3354/meps289201

Baldwin, B.S., Mayer, M.S., Dayton, J., Pau, N., Mendilla, J., Sullivan, M., Moore, a, Ma, a, Mills, E.L., 2002. Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for North American lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 59, 680–694. doi:10.1139/f02-043

Baldwin, B.S., Mayer, M.S., Dayton, J., Pau, N., Mendilla, J., Sullivan, M., Moore, a, Ma, a, Mills, E.L., 2002. Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for North American lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 59, 680–694. doi:10.1139/f02-043

Barbiero, R.P., Tuchman, M.L., Millard, E.S., 2006. Post-dreissenid Increases in transparency during summer stratification in the offshore waters of Lake Ontario: Is a reduction in whiting events the cause? J. Great Lakes Res. 32, 131–141. doi:10.3394/0380-1330(2006)32[131:PIITDS]2.0.CO;2

Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 48, 357–389. doi:10.1016/S0166-445X(00)00088-6

Barracco, M.A., Medeiros, I.D., Moreira, F.M., 1999. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. Fish Shellfish Immunol. 9, 387–404. doi:10.1006/fsim.1998.0196

Bastviken, D.T.E., Caraco, N.F., Cole, J.J., 1998. Experimental measurements of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) impacts on phytoplankton. Freshw. Biol. 39, 375–386. doi:10.1046/j.1365-2427.1998.00283.x

Baudrimont, M., Andrès, S., Metivaud, J., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. Environ. Toxicol. Chem. 18, 2472–2477. doi:10.1002/etc.5620181113

Beggel, S., Cerwenka, A., Brandner, J., Geist, J., 2015. Open accesshell morphological versus genetic identification of quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Aquat. Invasions 10, 93–99. doi:10.3391/ai.2015.10.1.09

Ben Cheikh, Y., Travers, M.-A., Morga, B., Godfrin, Y., Rioult, D., Le Foll, F., 2016. First evidence for a Vibrio strain pathogenic to *Mytilus edulis* altering hemocyte immune capacities. Dev. Comp. Immunol. 57, 107–119. doi:10.1016/j.dci.2015.12.014

Beninger, P.G., Le Pennec, G., Le Pennec, M., 2003. Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L. Biol. Bull. 205, 83–92.

Bennett, J., Weeds, A., 1986. Calcium and cytoskeleton. Br. Med. Bull. 42, 385–390.

Bervoets, L., Voets, J., Chu, S., Covaci, A., Schepens, P., Blust, R., 2004. Comparison of accumulation of micropollutants between igenous and transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Environ. Toxicol. Chem. 23, 1973–1983.

Bibby, R., Widdicombe, S., Parry, H., Spicer, J., Pipe, R., 2008. Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. Aquat. Biol. 2, 67–74. doi:10.3354/ab00037

Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Riva, C., Provini, A., 2009. Cytotoxic and genotoxic effects of in vitro exposure to Triclosan and Trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 150, 50–56. doi:10.1016/j.cbpc.2009.02.005

Binelli, A., Della Torre, C., Magni, S., Parolini, M., 2015. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. Environ. Pollut. 196, 386–403. doi:10.1016/j.envpol.2014.10.023

Binelli, A., Magni, S., Della Torre, C., Parolini, M., 2015. Toxicity decrease in urban wastewaters treated by a new biofiltration process. Sci. Total Environ. 537, 235–242. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.08.005

Binelli, A., Ricciardi, F., Riva, C., Provini, A., 2005. Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in Zebra mussels from the Italian Great Lakes. Chemosphere 61, 1074–1082. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.03.047

Binelli, A., Magni, S., Soave, C., Marazzi, F., Zuccato, E., Castiglioni, S., Parolini, M., Mezzanotte, V., 2014. The biofiltration process by the bivalve *D. polymorpha* for the removal of some pharmaceuticals and drugs of abuse from civil wastewaters. Ecol. Eng. 71, 710–721. doi:10.1016/j.ecoleng.2014.08.004

Binelli, A., Riva, C., Cogni, D., Provini, A., 2008. Assessment of the genotoxic potential of benzo(a)pyrene and pp'-dichlorodiphenyldichloroethylene in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 649, 135–145. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.08.011

Bocchetti, R., Regoli, F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis from Adriatic Sea. Chemosphere 65, 913–921. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.049

Bonner, T.P., Rockhill, R.L., 1994. Ultrastructure of the byssus of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*, Mollusca: Bivalvia). Trans. Am. Microsc. Soc. 113, 302–315.

Borcherding, J., 1991. The annual reproductive cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in lakes. Oecologia 87, 208–218. doi:10.1007/BF00325258

Borković, S.S., Saponjić, J.S., Pavlović, S.Z., Blagojević, D.P., Milosević, S.M., Kovacević, T.B., Radojicić, R.M., Spasić, M.B., Zikić, R. V, Saicić, Z.S., 2005. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel Mytilus galloprovincialis from the Adriatic Sea. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 141, 366–374. doi:10.1016/j.cbpc.2005.08.001

Bouki, E., Dimitriadis, V.K., Kaloyianni, M., Dailianis, S., 2013. Antioxidant and pro-oxidant challenge of tannic acid in mussel hemocytes exposed to cadmium. Mar. Environ. Res. 85, 13–20. doi:10.1016/j.marenvres.2012.12.005

Bowman, M.F., Bailey, R.C., 1998. Upper pH tolerance limit of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Can. J. Zool. Can. Zool. 76, 2119–2123.

Brousseau, P., Payette, Y., Flipo, D., Blakley, B., Boermans, H., Tryphonas, H., Fournier, M., 1998. Manual of Immunological Methods. CRC Press. 160pp

Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Fournier, M., 2000. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. Toxicology 142, 145–56.

Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L., 2004. Anti-microbial peptides- from invertebrates to vertebrates. Immunol. Rev. 198, 169–184.

Burkhard, M.J., Leavell, S., Weiss, R.B., Kuehnl, K., Valentine, H., Watters, G.T., Wolfe, B. A., 2009. Analysis and cytologic characterization of hemocytes from freshwater mussels (*Quadrula* sp.). Vet. Clin. Pathol. 38, 426–436. doi:10.1111/j.1939-165X.2009.00148.x

Butler, R.A., Roesijadi, G., 2001. Disruption of metallothionein expression with antisense oligonucleotides abolishes protection against cadmium cytotoxicity in molluscan hemocytes. Toxicol. Sci. 59, 101–107. doi:10.1093/toxsci/59.1.101

Butler, R. A., 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., Pal, S.G., 1995. Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. Cell Struct. Funct. 20, 355–67.

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

Campbell H.A., Couillard Y., 2004. Prise en charge et détoxication des métaux chez les organismes aquatiques. In: Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement. Eds.: E Pelletier, PGC Campbell and F Denizeau. Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy (Quebec), Canada, pp. 9-61.

Camus, L., Grøsvik, B.E., Børseth, J.F., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2000. Stability of lysosomal and cell membranes in haemocytes of the common mussel (*Mytilus edulis*): Effect of low temperatures. Mar. Environ. Res. 50, 325–329. doi:10.1016/S0141-1136(00)00056-8

Camusso, M., Balestrini, R., Binelli, A., 2001. Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. Chemosphere 44, 263–270. doi:10.1016/S0045-6535(00)00169-7

Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Fabbri, R., Canonico, B., Fantinati, A., Marcomini, A., Pojana, G., 2008. Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. Environ. Int. 34, 1114–9. doi:10.1016/j.envint.2008.04.002

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. Microsc. Res. Tech. 57, 469–76. doi:10.1002/jemt.10100

Caraco, N.F., Cole, J.J., Raymond, P. A., Strayer, D.L., Pace, M.L., Findlay, S.E.G., Fischer, D.T., 1997. Zebra mussel invasion in a large, turbid river: Phytoplankton response to increased grazing. Ecology 78, 588–602. doi:10.1890/0012-9658(1997)078[0588:ZMIIAL]2.0.CO;2

Carballal, M., Villalba, A, Lopez, C., 1998. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. J. Invertebr. Pathol. 72, 304–12.

Carignan, R., Lorrain, S., 2000. Sediment dynamics in the fluvial lakes of the St. Lawrence River: accumulation rates and characterization of the mixed sediment layer. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 63–77. doi:10.1139/f99-246

Cartier, S., Pellerin, J., Fournier, M., Tamigneaux, E., Girault, L., Lemaire, N., 2004. Use of an index based on the blue mussel (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) digestive gland weight to assess the nutritional quality of mussel farm sites. Aquaculture 241, 633–654. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.08.015

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

Chang, S., Tseng, S., Chou, H., 2005. Morphological Characterization via Light and Electron Microscopy of the hemocytes of two cultured bivalves: A comparison study between the hard clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). Zool. Stud. 44, 144–152.

Chase, M.E., Bailey, R.C., 1999. The Ecology of the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) in the Lower Great Lakes of North America: I. Population Dynamics and Growth. J. Great Lakes Res. 25, 107–121. doi:10.1016/S0380-1330(99)70720-3

Châtel, A., Faucet-Marquis, V., Gourlay-Francé, C., Pfohl-Leszkowicz, A., Vincent-Hubert, F., 2015. Genotoxicity and activation of cellular defenses in transplanted zebra mussels *Dreissena polymorpha* along the Seine river. Ecotoxicol. Environ. Saf. 114, 241–249. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.03.023

Chen Jiun-Hong, Bayne, C.J., 1995. Bivalve mollusc hemocyte behaviors: Characterization of hemocyte aggregation and adhesion and their inhibition in the California mussel (*Mytilus californianus*). Biol. Bull. 188, 255–266. doi:10.2307/1542303

Chen, M., Yang, H., Delaporte, M., Zhao, S., 2007. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge. Aquaculture 271, 479–487. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.051

Cheng, T.C., 1981. Bivalves. In: Ratcliffe, N.A. & Rowley, A.F. (eds) Invertebrate Blood Cells I. Academic Press, London, p 233-299.

Cheng, T.C., 1984. Invertebrate Blood. Springer US, Boston, MA. doi:10.1007/978-1-4684-4766-8

Cheng, T.C., 1988. *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: Total and differential cell counts. J. Invertebr. Pathol. 51, 207–214. doi:10.1016/0022-2011(88)90027-4

Cheng, T.C., 1990. Effects of in vivo exposure of *Crassostrea virginica* to heavy metals on hemocyte viability and activity levels of lysosomal enzymes. In: Perkins, F.O. & Cheng, T.C. (eds). Academic Press, San Diego, CA, p 513-524.

Cheng, W., Hsiao, I.S., Chen, J.C., 2004. Effect of nitrite on immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Dis. Aquat. Organ. 60, 157–164. doi:10.1016/j.fsi.2004.03.007

Cheng-Hua, L., Jian-Min, Z., Lin-Sheng, S., 2008. A review of advances in research on marine molluscan antimicrobial peptides and their potential application in aquaculture. Molluscan Res. 29, 17–26.

Cherkasov, A.S., Grewal, S., Sokolova, I.M., 2007. Combined effects of temperature and cadmium exposure on haemocyte apoptosis and cadmium accumulation in the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). J. Therm. Biol. 32, 162–170. doi:10.1016/j.jtherbio.2007.01.005

Cherkasov, A.S., Biswas, P.K., Ridings, D.M., Ringwood, A.H., Sokolova, I.M., 2006. Effects of acclimation temperature and cadmium exposure on cellular energy budgets in the marine mollusk *Crassostrea virginica*: linking cellular and mitochondrial responses. J. Exp. Biol. 209, 1274–1284. doi:10.1242/jeb.02093

Cho, S.M., Jeong, W.G., 2005. Spawning impact on lysosomal stability of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture 244, 383–387. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.12.013

Chu, F.-L.E., La Peyre, J.F., Burreson, C.S., 1993. *Perkinsus marinus* infection and potential defense-related activities in Eastern Oysters, *Crassostrea virginica*: salinity effects. J. Invertebr. Pathol. 62, 226–232. doi:10.1006/jipa.1993.1104

Ciacci, C., Fabbri, R., Betti, M., Roch, P., Canesi, L., 2009. Seasonal changes in functional parameters of the hemolymph of *Mytilus galloprovincialis*. Isj 6, 44–48.

Cima, F., Matozzo, V., Marin, M.G., Ballarin, L., 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. Fish Shellfish Immunol. 10, 677–93. doi:10.1006/fsim.2000.0282

Claxton, W.T., Wilson, A.B., Mackie, G.L., Boulding, E.G., 1998. A genetic and morphological comparison of shallow- and deep-water populations of the introduced dreissenid bivalve *Dreissena bugensis*. Can. J. Zool. 76, 1269–1276. doi:10.1139/cjz-76-7-1269

Claxton, W.T., Mackie, G.L., 1998. Seasonal and depth variations in gametogenesis and spawning of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis* in eastern Lake Erie. Can. J. Zool. 76, 2010. doi:10.1139/cjz-76-11-2010

Cloutier, P.-L., Fortin, F., Groleau, P.E., De Lafontaine, Y., Brousseau, P., Fournier, M., Desrosiers, M. En préparation. Bioaccumulation of PCBs, PAHs and PBDEs in freshwater and marine mussels in Eastern Canada.

Cochennec-Laureau, N., Auffret, M., Renault, T., Langlade, A., 2003. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. J. Invertebr. Pathol. 83, 23–30. doi:10.1016/S0022-2011(03)00015-6

Coles, J., Farley, S., Pipe, R., 1995. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. Dis. Aquat. Organ. 22, 59–65. doi:10.3354/dao022059

Contardo-Jara, V., Krueger, A., Exner, H.J., Wiegand, C., 2009. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Dreissena polymorpha* for detection of site impact in watercourses of Berlin. J. Environ. Monit. 11, 1147–1156. doi:10.1039/b820734h

Crosland-taylor, P.J., 1953. A Device for Counting Small Particles suspended in a Fluid through a Tube. Nature 171, 37–38. doi:10.1038/171037b0

Cuénot. L., 1891. Le sang et les glandes lymphatiques dans la série animale. Arch. Zool. Exper. 13-90

Cuhel, R., Aguilar, C., 2013. Ecosystem transformations of the Laurentian Great Lake Michigan by nonindigenous biological invaders. Mar. Sci. 5, 289–320. doi:10.1146/annurev-marine-120710-100952

Dailianis, S., 2009. Production of superoxides and nitric oxide generation in haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.) after exposure to cadmium: A possible involvement of Na+/H+ exchanger in the induction of cadmium toxic effects. Fish Shellfish Immunol. 27, 446–453. doi:10.1016/j.fsi.2009.06.016

Dang, C., Cribb, T.H., Osborne, G., Kawasaki, M., Bedin, A.S., Barnes, A.C., 2013. Effect of a hemiuroid trematode on the hemocyte immune parameters of the cockle *Anadara trapezia*. Fish Shellfish Immunol. 35, 951–956. doi:10.1016/j.fsi.2013.07.010

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

de Lafontaine Y, Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). Aquat. Toxicol. 50, 51–71.

De Zwaan, A., Eertman, R.H.M., 1996. Anoxic or aerial survival of bivalves and other euryoxic invertebrates as a useful response to environmental stress - A comprehensive review. Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 113, 299–312. doi:10.1016/0742-8413(95)02101-9

Deb, S.C., Fukushima, T., 1999. Metals in aquatic ecosystems: mechanisms of uptake, accumulation and release-Ecotoxicological perspectives. Int. J. Environ. Stud. 56, 385–417. doi:10.1080/00207239908711212

Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Jegaden, M., Moal, J., Pouvreau, S., Dégremont, L., Boudry, P., Samain, J.-F., 2007. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 353, 45–57. doi:10.1016/j.jembe.2007.09.003

Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S., Samain, J.-F., 2006. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. Aquaculture 254, 571–582. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.10.006

Delmott, S.E., Edds, D.R., 2014. Zebra mussel maturation and seasonal gametogenesis in Marion Reservoir ,. BioInvasion Rec. 3, 247–260. doi:http://dx.doi.org/10.3391/bir.2014.3.4.06

Di, G., Zhang, Z., Ke, C., 2013. Phagocytosis and respiratory burst activity of haemocytes from the ivory snail, *Babylonia areolata*. Fish Shellfish Immunol. 35, 366–374. doi:10.1016/j.fsi.2013.04.032

Diggins, T.P., 2001. A Seasonal Comparison of Suspended Sediment Filtration by Quagga (*Dreissena bugensis*) and Zebra (*D. polymorpha*) Mussels. J. Great Lakes Res. 27, 457–466. doi:10.1016/S0380-1330(01)70660-0

Domm, S., McCauley, R.W., Kott, E., Ackerman, J.D., 1993. Physiological and Taxonomic Separation of Two Dreissenid Mussels in the Laurentian Great Lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50, 2294–2297. doi:10.1139/f93-253

Donaghy, L., Hong, H.-K., Lambert, C., Park, H.-S., Shim, W.J., Choi, K.-S., 2010. First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus*. Fish Shellfish Immunol. 28, 87–97. doi:10.1016/j.fsi.2009.10.006

Donaghy, L., Jauzein, C., Volety, A.K., 2012a. First report of severe hemocytopenia and immunodepression in the sunray venus clam, *Macrocallista nimbosa*, a potential new aquaculture species in Florida. Aquaculture 364-365, 247–251. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.08.045

Donaghy, L., Kim, B.-K., Hong, H.-K., Park, H.-S., Choi, K.-S., 2009a. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. Fish Shellfish Immunol. 27, 296–301. doi:10.1016/j.fsi.2009.05.010

Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goïc, N., Lambert, C., Volety, A.K., Soudant, P., 2012b. Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement. PLoS One 7, e46594. doi:10.1371/journal.pone.0046594

Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K.-S., Soudant, P., 2009b. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. Aquaculture 297, 10–24. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.09.003

Donaghy, L., Volety, A.K., 2011. Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: in vitro impacts of temperature. Fish Shellfish Immunol. 31, 808–814. doi:10.1016/j.fsi.2011.07.018

Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 82, 47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001

Duchemin, M.B., Fournier, M., Auffret, M., 2007. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture 264, 73–81. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.12.030

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*. Env. Toxicol Chem 28, 402–408. doi:08-174 [pii]\n10.1897/08-174.1

Ellis, R.P., Spicer, J.I., Byrne, J.J., Sommer, U., Viant, M.R., White, D.A., Widdicombe, S., 2014. 1H NMR metabolomics reveals contrasting response by male and female mussels exposed to reduced seawater pH, increased temperature, and a pathogen. Environ. Sci. Technol. 48, 7044–7052. doi:10.1021/es501601w

Environnement Canada 2015: http://www.ec.gc.ca/stl/ consulté en mars 2016

Estrada, N., Velázquez, E., Rodríguez-Jaramillo, C., Ascencio, F., 2013. Morphofunctional study of hemocytes from lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. Immunobiology 218, 1093–1103. doi:10.1016/j.imbio.2013.03.004

Faisal, M., MacIntyre, E.A., Adham, K.G., Tall, B.D., Kothary, M.H., La Peyre, J.F., 1998. Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 121, 161–168. doi:10.1016/S0305-0491(98)10084-6

Fanslow, D.L., Nalepa, T.F., Lang, G. a., 1995. Filtration rates of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) on natural seston from Saginaw Bay, Lake Huron. J. Great Lakes Res. 21, 489–500. doi:10.1016/S0380-1330(95)71061-9

Faria, M., Ochoa, V., Blázquez, M., Juan, M.F.S., Lazzara, R., Lacorte, S., Soares, A.M.V.M., Barata, C., 2014. Separating natural from anthropogenic causes of impairment in Zebra

mussel (*Dreissena polymorpha*) populations living across a pollution gradient. Aquat. Toxicol. 152, 82–95. doi:10.1016/j.aquatox.2014.03.020

Fawcett, L.B., Tripp, M.R., 1994. Chemotaxis of *Mercenaria mercenaria* hemocytes to bacteria *in vitro*. J. Invertebr. Pathol. doi:10.1006/jipa.1994.1052

Feng, S.Y., JS Feng, T.J., 1977. Role of *Mytilus coruscus* and *Crassostrea gigas* blood cells in defense and nutrition. Comp. Pathobiol. 3:31-67

Finch, C.E., Austad, S.N., 2001. History and prospects: Symposium on organisms with slow aging. Exp. Gerontol. 36, 593–597. doi:10.1016/S0531-5565(00)00228-X

Fisher, S.W., 1986. Structure and functions of oyster hemocytes. In: Brehélin, M. (ed) Immunity in Invertebrates, Vol 3. Springer-Vrelag, Berlin Heidelberg, p 25-35.

Fisher, W.S., 2004. Antimicrobial activity of copper and zinc accumulated in Eastern oyster amebocytes. J. Shellfish Res. 23, 321–351.

Fisher, W.S., 2004. Relationship of amebocytes and terrestrial elements to adult shell deposition in eastern oysters. J. Shellfish Res. 23, 353–367.

Flye-Sainte-Marie, J., Soudant, P., Lambert, C., Le Goïc, N., Goncalvez, M., Travers, M.-A., Paillard, C., Jean, F., 2009. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 377, 1–11. doi:10.1016/j.jembe.2009.06.003

Foley, D. A., Cheng, T.C., 1972. Interaction of molluscs and foreign substances: The morphology and behavior of hemolymph cells of the American oyster, *Crassostrea virginica*, *in vitro*. J. Invertebr. Pathol.

Ford, S.E., Ashton-Alcox, K.A., Kanaley, S.A., 1994. Comparative cytometric and microscopic analyses of oyster hemocytes. J. Invertebr. Pathol. 64, 114–122. doi:10.1006/jipa.1994.1079

Fournier, M., Blakley, B., Boermans, H., Brousseau, P., 2005. Toxicologicical considerations—making the connection between toxicologic and immunotoxicologic studies as these relate to human and ecosystem health. In: Tryphonas, H., Fournier, M., Brousseau, P., Blakley, B., Smits, J., Investigative Immunotoxicology. Taylor and Francis, CRC Press, pp. 385–406.

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. doi:10.1093/icb/40.3.412

Franchini, A, Ottaviani, E., 2000. Repair of molluscan tissue injury: role of PDGF and TGF-beta1. Tissue Cell 32, 312–321. doi:10.1054/tice.2000.0118

Fraysse, J.-P. Baudin, J. Garnier-L, B., 2000. Cadmium uptake by *Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*: Effects of pH and temperature. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 65, 638–645. doi:10.1007/s001280000171

Fulwyler, M.J., 1965. Electronic Separation of Biological Cells by Volume. Science (80). 150, 910–911. doi:10.1126/science.150.3698.910

Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T., Renault, T., 2006. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. Cell Biol. Toxicol. 22, 1–14. doi:10.1007/s10565-006-0011-6

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

Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Fish Shellfish Immunol. 20, 536–47. doi:10.1016/j.fsi.2005.07.003

Gagné, F., Blaise, C., Aoyama, I., Luo, R., Gagnon, C., Couillard, Y., Campbell, P., Salazar, M., 2002. Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels. Environ. Toxicol. 17, 149–159. doi:10.1002/tox.10046

Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. Ecosystem management bioindicators: The ECOMAN project - A multi-biomarker approach to ecosystem management. Mar. Environ. Res. 58, 233–237. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.064

Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2001. Immunotoxicity in invertebrates measurement and ecotoxicological relevance. Ecotoxicology. doi:10.1023/A:1008939520263

García-García, E., Prado-Álvarez, M., Novoa, B., Figueras, A., Rosales, C., 2008. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. Dev. Comp. Immunol. 32, 637–653. doi:10.1016/j.dci.2007.10.004

Gazeau, F., Parker, L.M., Comeau, S., Gattuso, J.P., O'Connor, W.A., Martin, S., Portner, H.O., Ross, P.M., 2013. Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. Mar. Biol. 160, 2207–2245. doi:10.1007/s00227-013-2219-3

Gazeau, F., Quiblier, C., Jansen, J.M., Gattuso, J.P., Middelburg, J.J., Heip, C.H.R., 2007. Impact of elevated CO2 on shellfish calcification. Geophys. Res. Lett. 34, 1–5. doi:10.1029/2006GL028554

Gergs, R., Rinke, K., Rothhaupt, K.O., 2009. Zebra mussels mediate benthic-pelagic coupling by biodeposition and changing detrital stoichiometry. Freshw. Biol. 54, 1379–1391. doi:10.1111/j.1365-2427.2009.02188.x

Giambérini, L., 1993. Etude des mécanismes de transport et de detoxication des métaux lourds chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Rôle des hémocytes et des organes du système excréteur (histologie, ultrastructure, microanalyse). 196 p. Th. Doct. Sciences de la vie, écotoxicologie: Univ. Metz.

Giambérini, L., Auffret, M., Pihan, J.-C., 1996. Haemocytes of the Freshwater Mussel, *Dreissena Polymorpha* Pallas: Cytology, Cytochemistry and X-Ray Microanalysis. J. Molluscan Stud. 62, 367–379. doi:10.1093/mollus/62.3.367

Giambérini, L., Cajaraville, M.P., 2005. Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. Environ. Res. 98, 210–4. doi:10.1016/j.envres.2004.11.003

Giamberini, L., Pihan, J.C., 1996. The pericardial glands of the zebra mussel: Ultrastructure and implication in lead detoxication process. Biol. Cell 86, 59–65. doi:10.1016/0248-4900(96)89525-6

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

Givan, A.L., 2004. Flow cytometry: an introduction. Methods. Mol. Biol. 263, 1

Goedken, M., De Guise, S., 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. Fish Shellfish Immunol. 16, 539–552. doi:10.1016/j.fsi.2003.09.009

Goedken, M., Morsey, B., Sunila, I., De Guise, S., 2005. Immunomodulation of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* cellular defense mechanism by Perkinsus marinus. J. Shellfish Res. 24, 487–496. doi:10.2983/0730-8000(2005)24

Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C., 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. J. Biochem. Biophys. Methods 65, 45–80. doi:10.1016/j.jbbm.2005.10.003

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. Vitr. 17, 539–546. doi:10.1016/S0887-2333(03)00093-6

Gómez-Mendikute, A., Etxeberria, A., Olabarrieta, I., Cajaraville, M.P., 2002. Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene. Mar. Environ. Res. 54, 431–436. doi:10.1016/S0141-1136(02)00177-0

Gourdon, I., Guérin, M.C., Torreilles, J., Roch, P., 2001. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Nitric Oxide 5, 1–6. doi:10.1006/niox.2000.0327

Graczyk, T.K., Conn, D.B., Marcogliese, D.J., Graczyk, H., De Lafontaine, Y., 2003. Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). Parasitol. Res. 89, 107–112. doi:10.1007/s00436-002-0729-x

Graham, K., Kunze, E., Hammerstedt, H., 1990. Analysis of Sperm cell viability, Acrosomal Integrity and Mitochnondrial Fonction Using Flow cytometry. Biol. Reprod. 43, 55–64.

Graney, R.L. Jr., Cherry, D.S., Cairns, J., 1983. The influence of substrate, pH, diet and temperature upon cadmium ccumulation in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in laboratory artificial streams. Water Res. I, 833–842.

Greco, L., Pellerin, J., Capri, E., Garnerot, F., Louis, S., Fournier, M., Sacchi, A., Fusi, M., Lapointe, D., Couture, P., 2011. Physiological effects of temperature and a herbicide mixture on the soft-shell clam *Mya arenaria* (Mollusca, Bivalvia). Environ. Toxicol. Chem. 30, 132–141. doi:10.1002/etc.359

Green, T.J., Barnes, A.C., 2010. Reduced salinity, but not estuarine acidification, is a cause of immune-suppression in the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 402, 161–170. doi:10.3354/meps08430

Griffiths, R., 1991. Distribution and dispersal of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the Great Lakes region. Can. J. Fish Aquat. Sci. 48, 1381–1388.

Groupe de travail Suivi de l'état du Saint-Laurent. 2014. Portrait global de l'état du Saint-Laurent 2014. Plan Saint-Laurent. Environnement Canada, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs du Québec, Parcs Canada, Pêches et Océans Canada et Stratégies Saint-Laurent, 53 p.

Guerlet, E., Ledy, K., Meyer, A., Giambérini, L., 2007. Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussels: A 2-year integrative field study of seasonal and pollution-induced variations. Aquat. Toxicol. 81, 377–388. doi:10.1016/j.aquatox.2006.12.016

Guerlet, E., Vasseur, P., Giambérini, L., 2010. Spatial and temporal variations of biological responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 1170–1181. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.05.009

Hanington, P.C., Zhang, S.M., 2011. The primary role of fibrinogen-related proteins in invertebrates is defense, not coagulation. J. Innate Immun. 3, 17–27. doi:10.1159/000321882

Hauton, C., Hawkins, L.E., Hutchinson, S., 1998. The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L). Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 119, 619–623. doi:10.1016/S0305-0491(98)00036-4

Hebert, P.D.N., Muncaster, B.W., Mackie, L., 1989. Ecological and Genetic Studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas): a new mollusc in the Great Lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46, 1587–1591.

Hégaret, H., Wikfors, G., Soudant, P., Delaporte, M., Alix, J.., Smith, B.., Dixon, M., Quére, C., Le Coz, J., Paillard, C., Moal, J., Samain, J.-F., 2004. Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. Aquaculture 234, 541–560. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.01.010

Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 293, 237–248. doi:10.1016/S0022-0981(03)00236-3

Heise, K., Puntarulo, S., Pörtner, H.O., Abele, D., 2003. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol. 134, 79–90. doi:10.1016/S1532-0456(02)00212-0

Hellou, J., Law, R.J., 2003. Stress on stress response of wild mussels, Mytilus edulis and Mytilus trossulus, as an indicator of ecosystem health. Environ. Pollut. 126, 407–416. doi:10.1016/S0269-7491(03)00231-8

Herwig, H.J., Brands, F., Kruitwagen, E., Zandee, D.I., 1989. Bioaccumulation and histochemical localization of cadmium in *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium chloride. Aquat. Toxicol. 15, 269–286.

Heugens, E.H.W., Hendriks, A.J., Dekker, T., van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. Crit. Rev. Toxicol. 31, 247–284. doi:10.1080/20014091111695

Hine, P.M., Wesney, B., 1994. Interaction of phagocytosed *Bonamia* sp. (Haplosporidia) with haemocytes of oysters *Tiostrea chilensis*. Dis. Aquat. Organ. 20, 219–229.

Hine, P., 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. Fish Shellfish Immunol. 9, 367–385. doi:10.1006/fsim.1998.0205

Holland, R.E., 1993. Changes in planctonic diatoms and water transparency in Hatchery Bay, Bass Island Area, Western Lake Erie since establishment of the zebra mussel. J. Great Lakes Res. 19, 617–624.

Holmstrup, M., Bindesbøl, A.M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Køhler, H.R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P.E., Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. Sci. Total Environ. 408, 3746–3762. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.10.067

Hong, H.K., Donaghy, L., Park, H.S., Choi, K.S., 2014. Influence of reproductive condition of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* on hemocyte parameters during early post-spawning period. Aquaculture 434, 241–248. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.08.019

Hong, H.-K., Kang, H.-S., Le, T.C., Choi, K.-S., 2013. Comparative study on the hemocytes of subtropical oysters *Saccostrea kegaki* (Torigoe & Inaba, 1981), *Ostrea circumpicta* (Pilsbry, 1904), and *Hyotissa hyotis* (Linnaeus, 1758) in Jeju Island, Korea: Morphology and functional aspects. Fish Shellfish Immunol. 35, 2020–2025. doi:10.1016/j.fsi.2013.09.022

Hulett, H.R., Bonner, W.A., Sweet, R.G., Herzenberg, L.A., 1973. Development and application of a rapid cell sorter. Clin. Chem. 19, 813–816.

Hurtado, M.Á., da Silva, P.M., Le Goïc, N., Palacios, E., Soudant, P., 2011. Effect of acclimatization on hemocyte functional characteristics of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*). Fish Shellfish Immunol. 31, 978–84. doi:10.1016/j.fsi.2011.08.016

Ivanina, A. V., Taylor, C., Sokolova, I.M., 2009. Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). Aquat. Toxicol. 91, 245–254. doi:10.1016/j.aquatox.2008.11.016

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:10.1016/j.fsi.2014.02.016

Ivanina, A. V., Sokolova, I.M., 2013. Interactive effects of pH and metals on mitochondrial functions of intertidal bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. Aquat. Toxicol. 144-145, 303–309. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.019

Iwanyzki, S., and McCauley, R. W., 1992. Upper lethal temperatures of adult zebra mussels. In Zebra mussels: Biology, impacts, and control, T. F. Nalepa and D. W. Schloesser, ed., Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 667-673.

Izagirre, U., Errasti, A., Bilbao, E., Múgica, M., Marigómez, I., 2014. Combined effects of thermal stress and Cd on lysosomal biomarkers and transcription of genes encoding lysosomal enzymes and HSP70 in mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 149, 145–156. doi:10.1016/j.aquatox.2014.01.013

Jauzein, C., Donaghy, L., Volety, A.K., 2013. Flow cytometric characterization of hemocytes of the sunray venus clam macrocallista nimbosa and influence of salinity variation. Fish Shellfish Immunol. 35, 716–724. doi:10.1016/j.fsi.2013.06.003

Jemaà, M., Morin, N., Cavelier, P., Cau, J., Strub, J.-M., Delsert, C., 2014. Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oyster. J. Exp. Biol. 3067–3077. doi:10.1242/jeb.106575

Jenner, H. A., Janssen-Mommen, J. P. M., 1992. Monitoring and control of Dreissena polymorpha and other macrofouling bivalves in the Netherlands. In Zebra mussels: Biology, impacts, and control, T. F. Nalepa and D. W. Schloesser, ed., Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 537-554.

Jesus, C.M., 1997. In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk haemocytes. Fish Shellfish Immunol. 7, 403–416. doi:10.1006/fsim.1997.0094

Johansson, M.W., 1999. Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. Dev. Comp. Immunol. 23, 303–315. doi:10.1016/S0145-305X(99)00013-0

Johns, C., 2011. Quagga mussels (*Dreissena bugensis*) as biomonitors of metal contamination: A case study in the upper St. Lawrence River. J. Great Lakes Res. 37, 140–146. doi:10.1016/j.jglr.2010.11.002

Johns, C., Timmerman, B.E., 1998. Total Cadmium, Copper, and Zinc in Two Dreissenid Mussels, *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*, at the Outflow of Lake Ontario. J. Great Lakes Res. 24, 55–64. doi:10.1016/S0380-1330(98)70799-3

Jones, L., Ricciardi, A., 2005. Influence of physicochemical factors on the distribution and biomass of invasive mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*) in the St. Lawrence River. Can. J. Fish. 62, 1953–1962. doi:10.1139/f05-096

Jørgensen, C., Kørboe, T., Møhlenberg, F., Riisgård, H., 1984. Ciliary and mucus-net filter feeding, with special reference to fluid mechanical Characteristics . Mar. Ecol. Prog. Ser. 15, 283–292. doi:10.3354/meps015283

Juhel, G., Culloty, S.C., O'Riordan, R.M., Connor, J.O., De Faoite, L., McNamara, R., 2003. A histological study of the gametogenic cycle of the freshwater mussel *Dreissena Polymorpha* (Pallas , 1771) in Lough Derg , Ireland. J. Moll. Stud. 69, 365–373. doi:10.1093/mollus/69.4.365

Kalachova, K., Pulkrabova, J., Drabova, L., Cajka, T., Kocourek, V., Hajslova, J., 2011. Simplified and rapid determination of polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, and polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and shrimps integrated into a single method. Anal. Chim. Acta 707, 84–91. doi:10.1016/j.aca.2011.09.016

Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J. a, Dennery, P. A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts, L.J., Ischiropoulos, H., 2012. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. Free Radic. Biol. Med. 52, 1–6. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030

Karatayev, A.Y., Boltovskoy, D., Padilla, D.K., Burlakova, L.E., 2007. The invasive bivalves *Dreissena polymorpha* and *Limnoperna fortunei*: parallels, contrasts, potential spread and invasion impacts. J. Shellfish Res. 26, 205–213. doi:10.2983/0730-8000(2007)26[205:TIBDPA]2.0.CO;2

Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Mastitsky, S.E., Padilla, D.K., Mills, E.L., 2011. Contrasting rates of spread of two congeners, *Dreissena polymorpha* and *Dreissena Rostriformis Bugensis* at different spatial scales. J. Shellfish Res. 30, 923–931. doi:10.2983/035.030.0334

Karatayev, A. Y., Burlakova, L. E., Padilla, D.K. 2014a. General overview of zebra and quagga mussels what we do and do not know. In T. F. Nalepa and D. W. Schloesser (eds.) Quagga and Zebra Mussels: Biology, Impacts, and Control. 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 695-703.

Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K., 2014b. Zebra versus quagga mussels: a review of their spread, population dynamics, and ecosystem impacts. Hydrobiologia. doi:10.1007/s10750-014-1901-x

Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Pennuto, C., Ciborowski, J., Karatayev, V.A., Juette, P., Clapsadl, M., 2014. Twenty five years of changes in *Dreissena* spp. populations in Lake Erie. J. Great Lakes Res. 40, 550–559. doi:10.1016/j.jglr.2014.04.010

Karatayev, A., Burlakova, I.L.E., Padilla, D.K., 1998. Physical factors that limit the distribution and abundance of *Dreissena polymorpha* (Pallas). J. Shellfish Res. 17, 1219–1235.

Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K., 2013. General Overview of Zebra and Quagga Mussels, in: Quagga and Zebra Mussels. CRC Press, pp. 695–704. doi:10.1201/b15437-53

Karatayev, A., Burlakova, L., Padilla, D., 2002. Impacts of zebra mussels on aquatic communities and their role as ecosystem engineers. Invasive Aquat. species Eur.

Katsumiti, A., Gilliland, D., Arostegui, I., Cajaraville, M.P., 2014. Cytotoxicity and cellular mechanisms involved in the toxicity of CdS quantum dots in hemocytes and gill cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 153, 39–52. doi:10.1016/j.aquatox.2014.02.003

Kiss, T., 2010. Apoptosis and its functional significance in molluscs. Apoptosis an Int. J. Program. cell death 15, 313–321. doi:10.1007/s10495-009-0446-3

Knigge, T., Dahboul, F., Alain, D., Monsinjon, T., 2015. The gametogenic cycle and oestradiol levels in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*: A 1-year study. J. Molluscan Stud. 81, 58–65. doi:10.1093/mollus/eyu056

Koutsogiannaki, S., Evangelinos, N., Koliakos, G., Kaloyianni, M., 2006. Cytotoxic mechanisms of Zn2+ and Cd2+ involve Na+/H+ exchanger (NHE) activation by ROS. Aquat. Toxicol. 78, 315–324. doi:10.1016/j.aquatox.2006.04.004

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

Koutsogiannaki, S., Franzellitti, S., Kalogiannis, S., Fabbri, E., Dimitriadis, V.K., Kaloyianni, M., 2015. Effects of cadmium and 17 β-estradiol on *Mytilus galloprovincialis* redox status. Prooxidant-antioxidant balance (PAB) as a novel approach in biomonitoring of marine environments. Mar. Environ. Res. 103, 80–88. doi:10.1016/j.marenvres.2014.11.007

Kovalak, W.P., Longton, G.D., Smithee, R.D., 1993. Infestation of power plant systems by the zebra mussel. In: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), The Zebra Mussel: Biology, Impacts and Control. Lewis, Boca Raton, FL, pp. 359–380.

Kuhns, L.A., Berg, M.B., 1999. Benthic invertebrate community responses to round goby (Neogobius melanostomus) and zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) invasion in southern Lake Michigan. J. Great Lakes Res. 25, 910–917. doi:10.1016/S0380-1330(99)70788-4

Kurihara, H., Kato, S., Ishimatsu, A., 2007. Effects of increased seawater pCO2 on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. Aquat. Biol. 1, 91–98. doi:10.3354/ab00009

Kwan, K., Chan, H., Lafontaine, Y. De, 2003. Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) along the St. Lawrence River. Environ. Monit. Assess. 88, 193–219.

La Peyre, J.F., Yarnall, H. a, Faisal, M., 1996. Contribution of *Perkinsus marinus* extracellular products in the infection of eastern oysters (*Crassostrea virginica*). J. Invertebr. Pathol. 68, 312–313. doi:10.1006/jipa.1996.0102

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

Ladhar-Chaabouni, R., Machreki-Ajmi, M., Serpentini, A., Lebel, J.M., Hamza-Chaffai, A., 2015. Does a short-term exposure to cadmium chloride affects haemocyte parameters of the marine gastropod Haliotis tuberculata? Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 17343–17349. doi:10.1007/s11356-014-3387-5

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. & Ramade, F., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie – aspects fondammentaux, Masson, Paris, 419 p.

Laing, K.J., Cunningham, C., Secombes, C.J., 2000. Genes for three different isoforms of transforming growth factor-beta are present in plaice (*Pleuronectes platessa*) DNA. Fish Shellfish Immunol. 10, 261–271. doi:10.1006/fsim.1999

Lajtner, J., Lucić, A., Marušić, M., Erben, R., 2008. The effects of the trematode *Bucephalus polymorphus* on the reproductive cycle of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in the Drava River. Acta Parasitol. 53, 85–92. doi:10.2478/s11686-008-0011-1

Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. Fish Shellfish Immunol. 15, 225–40.

Lambert, C., Soudant, P., Dégremont, L., Delaporte, M., Moal, J., Boudry, P., Jean, F., Huvet, A., Samain, J.-F., 2007a. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. Aquaculture 270, 276–288. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.03.016

Lambert, C., Soudant, P., Jegaden, M., Delaporte, M., Labreuche, Y., Moal, J., Samain, J.-F., 2007b. *In vitro* modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in *Crassostrea gigas* hemocytes. Aquaculture 270, 413–421. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.074

Lannig, G., Cherkasov, a S., Sokolova, I.M., 2006a. Temperature-dependent effects of cadmium on mitochondrial and whole-organism bioenergetics of oysters (*Crassostrea virginica*). Mar. Environ. Res. 62 Suppl, S79–82. doi:10.1016/j.marenvres.2006.04.010

Lannig, G., Flores, J.F., Sokolova, I.M., 2006b. Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. Aquat. Toxicol. 79, 278–287. doi:10.1016/j.aquatox.2006.06.017

Laruelle, F., Molloy, D.P., Roitman, V. a, 2002. Histological analysis of trematodes in *Dreissena polymorpha*: their location, pathogenicity, and distinguishing morphological characteristics. J. Parasitol. 88, 856–63. doi:10.1645/0022-3395(2002)088[0856:HAOTID]2.0.CO;2

Laskowski, R., Bednarska, A.J., Kramarz, P.E., Loureiro, S., Scheil, V., Kud łek, J., Holmstrup, M., 2010. Interactions between toxic chemicals and natural environmental factors - A meta-analysis and case studies. Sci. Total Environ. 408, 3763–3774. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.01.043

Latire, T., Le Pabic, C., Mottin, E., Mottier, A., Costil, K., Koueta, N., Lebel, J.-M., Serpentini, A., 2012. Responses of primary cultured haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride. Aquat. Toxicol. 109, 213–221. doi:10.1016/j.aquatox.2011.09.017

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, 372–86. doi:10.1016/j.fsi.2009.11.011

Le Goff, J., Gallois, J., Pelhuet, L., Devier, M.H., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Cachot, J., 2006. DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas. Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. Aquat. Toxicol. 79, 55–64. doi:10.1016/j.aquatox.2006.05.002

Le Pabic, C., Goux, D., Guillamin, M., Safi, G., Lebel, J.-M., Koueta, N., Serpentini, A., 2014. Hemocyte morphology and phagocytic activity in the common cuttlefish (*Sepia officinalis*). Fish Shellfish Immunol. 1–12. doi:10.1016/j.fsi.2014.07.020

Li, H., Parisi, M., Parrinello, N., Cammarata, M., Roch, P., 2011. Molluscan antimicrobial peptides, a review from activity-based evidences to computer- assisted sequences Abstract Antimicrobial peptides (AMPs) represent the most universal immune effectors . Molluscs constitute the second largest animal phylum , after. Immunobiology 85–97.

Li, H., Venier, P., Prado-Alvárez, M., Gestal, C., Toubiana, M., Quartesan, R., Borghesan, F., Novoa, B., Figueras, A., Roch, P., 2010. Expression of *Mytilus* immune genes in response to experimental challenges varied according to the site of collection. Fish Shellfish Immunol. 28, 640–648. doi:10.1016/j.fsi.2009.12.022

Li, S., Liu, Y., Liu, C., Huang, J., Zheng, G., Xie, L., Zhang, R., 2015. Morphology and classification of hemocytes in Pinctada fucata and their responses to ocean acidification and warming. Fish Shellfish Immunol. 45, 194–202. doi:10.1016/j.fsi.2015.04.006

Li, Y., Qin, J.G., Abbott, C. A, Li, X., Benkendorff, K., 2007. Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas*: an explanation for summer mortality in Pacific oysters. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 293, R2353–62. doi:10.1152/ajpregu.00463.2007

López, C., Carballal, M.J., Azevedo, C., Villalba, A., 1997. Morphological Characterization of the Hemocytes of the Clam,*Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). J. Invertebr. Pathol. 69, 51–57. doi:10.1006/jipa.1996.4639

Lopez-Cortes, L., Castro, D., Navas, J.I., Borrego, J.J., 1999. Phagocytic and chemotactic responses of manila and carpet shell clam haemocytes against *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease. Fish Shellfish Immunol. 9, 543–555. doi:10.1006/fsim.1999.0211

Lowe, D., Fossato, V., 2000. The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon. Aquat. Toxicol. 48, 75–85.

Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., 2008. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. Global Invasive Species Program.

Luengen, A.C., Friedman, C.S., Raimondi, P.T., Flegal, A.R., 2004. Evaluation of mussel immune responses as indicators of contamination in San Francisco Bay. Mar. Environ. Res. 57, 197–212. doi:10.1016/S0141-1136(03)00070-9

MacIsaac, H.J., 1996. Potential abiotic and biotic impacts of zebra mussels on the inland waters of North America . Am. Zool. 36, 287–299. doi:10.1093/icb/36.3.287

Mackenzie, C.L., Lynch, S.A., Culloty, S.C., Malham, S.K., 2014. Future oceanic warming and acidification alter immune response and disease status in a commercial shellfish species, *Mytilus edulis* L. PLoS One 9. doi:10.1371/journal.pone.0099712

Mackie, G.L., Gibbons, W.N., Muncaster, B.W., Gray, I.M., 1989. The zebra mussel, *Dreissena polymorpha*: a synthesis of European experiences and a preview for North America, Report prepared for Water Resources Branch, Great Lakes Section, Department of Energy, Mines and Resources. Available from Queens Printer for Ontario.

Mackie, G., 1991. Biology of the exotic zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in relation to native bivalves and its potential impact in Lake St. Clair. Hydrobiologia 219, 251–268.

Mackie, G., Schloesser, D., 1996. Comparative biology of zebra mussels in Europe and North America: an overview. Am. Zool. 258, 244–258.

Malagoli, D., Casarini, L., Ottaviani, E., 2008. Effects of the marine toxins okadaic acid and palytoxin on mussel phagocytosis. Fish Shellfish Immunol. 24, 180–186. doi:10.1016/j.fsi.2007.10.012

Malagoli, D., Ottaviani, E., 2005. Cytotoxicity as a marker of mussel health status. J. Mar. Biol. Assoc. UK 85, 359–362. doi:10.1017/S0025315405011276h

Malham, S.K., Cotter, E., O'Keeffe, S., Lynch, S., Culloty, S.C., King, J.W., Latchford, J.W., Beaumont, A.R., 2009. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of temperature and nutrients on health and survival. Aquaculture 287, 128–138. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.006

Marie, D., Brussaard, C., Thyrhaug, R., Bratbak, G., Vaulot, D., 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. Appl. Environ. Microbiol. 65, 45–52.

Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. Microsc. Res. Tech. 56, 358–392. doi:10.1002/jemt.10040

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., Jenkins, K.D., 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In Tessier, A., Turner, D.R., (edt.), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems, Chichester, John Wiley and Sons, p. 479-608.

Mateo, D.R., Spurmanis, A., Siah, A., Araya, M.T., Kulka, M., Berthe, F.C.J., Johnson, G.R., Greenwood, S.J., 2009. Changes induced by two strains of *Vibrio splendidus* in haemocyte subpopulations of *Mya arenaria*, detected by flow cytometry with LysoTracker. Dis. Aquat. Organ. 86, 253–262. doi:10.3354/dao02121

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, 163–70. doi:10.1007/s002440010234

Matozzo, V., Marin, M.G., 2011. Bivalve immune responses and climate changes : is there a relationship ? Invertebr. Surviv. J. 8, 70–77.

Matozzo, V., Chinellato, A., Munari, M., Finos, L., Bressan, M., Marin, M.G., 2012. First evidence of immunomodulation in bivalves under seawater acidification and increased temperature. PLoS One 7, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0033820

Matozzo, V., Marin, M., 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

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

Matozzo, V., Rova, G., Marin, M.G., 2007. Haemocytes of the cockle *Cerastoderma glaucum*: morphological characterisation and involvement in immune responses. Fish Shellfish Immunol. 23, 732–46. doi:10.1016/j.fsi.2007.01.020

Matthews, J., Schipper, A.M., Hendriks, A.J., Yen Le, T.T., Bij De Vaate, A., Van Der Velde, G., Leuven, R.S.E.W., 2015. A dominance shift from the zebra mussel to the invasive quagga mussel may alter the trophic transfer of metals. Environ. Pollut. 203, 183–190. doi:10.1016/j.envpol.2015.03.032

May, B., Marsden, J.E., 1992. Genetic identification and implications of another invasive species of dreissenid mussel in the Great Lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49, 1501–1506. doi:10.1139/f92-166

Mchenery, J.G., Birkbeck, T.H., Allen, J.A., 1979. The occurence of lysozyme in marine bivalves. Comp. Biochem. Physiol. Part B. 63, 25–28.

McLaughlan, C., Aldridge, D.C., 2013. Cultivation of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) within their invaded range to improve water quality in reservoirs. Water Res. 47, 4357–4369. doi:10.1016/j.watres.2013.04.043

Mcmahon, R.F., 1996. The physiological ecology of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in North America and Europe. Integr. Comp. Biol. 36, 339–363. doi:10.1093/icb/36.3.339

McMahon, R.F., Matthews, M.A., Ussery, T.A., Chase, R., Clarke, M., 1994. Further studies of heat tolerance in zebra mussels: Effects of temperature acclimation and chronic exposure to lethal temperatures. Proc. fourth Int. zebra mussel Conf. 251–272.

Meehan, S., Shannon, A., Gruber, B., M. Rackl, S., E. Lucy, F., 2014. Ecotoxicological impact of Zequanox®, a novel biocide, on selected non-target Irish aquatic species. Ecotoxicol. Environ. Saf. 107, 148–153. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.05.017

Mellina, E., Rasmussen, J.B., 1994. Patterns in the distribution and abundance of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in rivers and lakes in relation to substrate and other physicochemical factors. Can. J. Fish. Aquat. Sci. doi:10.1139/f94-102

Mills, E.L., Roseman, E.F., Rutzke, M., Gutenmann, W.H., Lisk, D.J., 1993. Contaminant and nutrient element levels in soft tissues of zebra and quagga mussels from waters of southern Lake Ontario. Chemosphere 27, 1465–1473. doi:10.1016/0045-6535(93)90241-V

Mills, E.L., Rosenberg, G., Spidle, A.P., Ludyanskiy, M., Pligin, Y., May, B., 1996. A Review of the biology and ecology of the Quagga Mussel (*Dreissena bugensis*), a second species of freshwater dreissenid introduced to North America 1. Am. Soc. Zool. 286, 271–286. doi:10.1093/icb/36.3.271

Minguez, L., Brulé, N., Sohm, B., Devin, S., Giambérini, L., 2013. Involvement of Apoptosis in Host-Parasite Interactions in the Zebra Mussel. PLoS One 8. doi:10.1371/journal.pone.0065822

Minier, C., Abarnou, A., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A.-M., Tutundjian, R., Bocquené, G., Leboulenger, F., 2006. A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Environ. Toxicol. Chem. 25, 112–119.

Mitta, G., Vandenbulcke, F., Noël, T., Romestand, B., Beauvillain, J.C., Salzet, M., Roch, P., 2000. Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. J. Cell Sci. 113, 2759–2769.

Mix, M.C., 1976. A general model for leucocyte cell renewal in bivalve mollusks. Mar. Fish. Rev. 37–41.

Moldavan, a, 1934. Photo-Electric Technique for the Counting of Microscopical Cells. Science 80, 188–189. doi:10.1126/science.80.2069.188

Molloy, D.P., Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Kurandina, D.P., Laruelle, F., 1997. Natural enemies of zebra mussels: Predators, parasites, and ecological competitors. Rev. Fish. Sci. 5, 27–97. doi:10.1080/10641269709388593

Molloy, D.P., Mayer, D.A., Gaylo, M.J., Morse, J.T., Presti, K.T., Sawyko, P.M., Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Laruelle, F., Nishikawa, K.C., Griffin, B.H., 2013a. Pseudomonas fluorescens strain CL145A - a biopesticide for the control of zebra and quagga mussels (Bivalvia: Dreissenidae). J. Invertebr. Pathol. 113, 104–114. doi:10.1016/j.jip.2012.12.012

Molloy, D.P., Mayer, D.A., Giamberini, L., Gaylo, M.J., 2013b. Mode of action of *Pseudomonas fluorescens* strain CL145A, a lethal control agent of dreissenid mussels (Bivalvia: *Dreissenidae*). J. Invertebr. Pathol. 113, 115–121. doi:10.1016/j.jip.2012.12.013

Monari, M., Matozzo, V., Foschi, J., Cattani, O., Serrazanetti, G.P., Marin, M.G., 2007. Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. Fish Shellfish Immunol. 22, 98–114. doi:10.1016/j.fsi.2006.03.016

Moore, M.N., Lowe, D.M., 1977. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. J. Invertebr. Pathol. 29, 18–30. doi:10.1016/0022-2011(77)90167-7

Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Paul Leonard, D.R., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 552, 247–268. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.028

Moreau, P., Burgeot, T., Renault, T., 2014. Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemocyte are not affected by a mixture of pesticides in short-term *in vitro* assays. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 4940–4949. doi:10.1007/s11356-013-1931-3

Morgan, I.J., Macdonald, D.G., Wood, C.M., 2001. The cost of living for freshwater fish in a warmer, more polluted world. Glob. Chang. Biol. 7, 345–355. doi:10.1046/j.1365-2486.2001.00424.x

Mortensen, S., Glette, J., 1996. Phagocytic activity of scallop (*Pecten maximus*) haemocytes maintained in vitro. Fish Shellfish Immunol. 6, 111–121. doi:10.1006/fsim.1996.0012

Morton, B., 1969a. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. I. General anatomy and morphology. J. Invertebr. Pathol. 38, 301–321.

Morton, B., 1969b. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. II. Correlation of the rhythms of adductor activity, feeding, digestion and excretion. J. Invertebr. Pathol. 38, 401–414.

Mosca, F., Narcisi, V., Cargini, D., Calzetta, A., Tiscar, P.G., 2011. Age related properties of the Adriatic clam *Chamelea gallina* (L. 1758) hemocytes. Fish Shellfish Immunol. 31, 1106–12. doi:10.1016/j.fsi.2011.09.017

Mount, A.S., Wheeler, a P., Paradkar, R.P., Snider, D., 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. Science 304, 297–300. doi:10.1126/science.1090506

Mubiana, V.K., Blust, R., 2007. Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. Mar. Environ. Res. 63, 219–235. doi:10.1016/j.marenvres.2006.08.005

Mydlarz, L.D., Jones, L.E., Harvell, C.D., 2006. Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 37, 251–288. doi:10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110103

Nakayama, K., Nomoto, A.M., Nishijima, M., Maruyama, T., 1997. Morphological and functional characterization of hemocytes in the giant clam, *Tridacna crocea*. Dev. Comp. Immunol. 21, 67. doi:10.1016/S0145-305X(97)87961-X

Nalepa, T. F., Schloesser, D. W., 1992. Zebra mussels biology, impacts, and control. CRC Press.

Neary, B.P., Leach, H., 1998. Mapping the Potentia Spread of the Zebra Musse in Ontario. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1990.

Nichols, S.J., Black, M.G., 1994. Identification of larvae : the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), quagga mussel (*Dreissena rosteriformis bugensis*), and Asian clam (*Corbicula fluminea*)'. Can. J. Zool. 72, 406–417. doi:10.1139/z94-057

O'Connor, T.P., 2002. National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. Mar. Environ. Res. 53, 117–143. doi:10.1016/S0141-1136(01)00116-7

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. In Vitro 15, 511–7.

Olson, R.J., Vaulot, D., Chisholm, S.W., 1985. Marine phytoplankton distributions measured using shipboard flow cytometry. Deep Sea Res. Part A. Oceanogr. Res. Pap. 32, 1273–1280. doi:10.1016/0198-0149(85)90009-3

Ordás, M.C., Novoa, B., Figueras, A., 1999. Phagocytosis inhibition of clam and mussel heamocytes by *Perkinsus atlanticus* secretion products. Fish Shellfish Immunol. 9, 491–503. doi:10.1006/fsim.1999.0208

Ottaviani, E., 2006. Molluscan immunorecognition. Invertebr. Surviv. J. 3, 50–63.

Ottaviani, E., 2011. Immunocyte : the invertebrate counterpart of the vertebrate macrophage. ISJ 8, 1–4.

Ottaviani, E., Franchini, a, Malagoli, D., Genedani, S., 2000. Immunomodulation by recombinant human interleukin-8 and its signal transduction pathways in invertebrate hemocytes. Cell. Mol. Life Sci. 57, 506–513. doi:10.1007/PL00000711

Paillard, C., Allam, B., Oubella, R., 2004. Effect of temperature on defense parameters in manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Dis. Aquat. Organ. 59, 249–62. doi:10.3354/dao059249

Pain, S., Parant, M., 2007. Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. Chemosphere 67, 1258–1263. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.11.017

Palais, F., Dedourge-Geffard, O., Beaudon, a, Pain-Devin, S., Trapp, J., Geffard, O., Noury, P., Gourlay-Francé, C., Uher, E., Mouneyrac, C., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, a, 2012. One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Ecotoxicology 21, 888–905. doi:10.1007/s10646-012-0851-1

Palais, F., Mouneyrac, C., Dedourge-Geffard, O., Giambérini, L., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, a, 2011. One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Chemosphere 83, 1062–73. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.060

Pampanin, D.M., Volpato, E., Marangon, I., Nasci, C., 2005. Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice. Survival in air and condition index. Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. 140, 41–52. doi:10.1016/j.cbpb.2004.10.016

Parolini, M., Binelli, A., 2012. Cyto-genotoxic effects induced by three brominated diphenyl ether congeners on the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 79, 247–255. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.01.008

Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Provini, A., 2010. Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Chemosphere 79, 489–98. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.02.053

Parolini, M., Binelli, A., Provini, A., 2011.a Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 1586–1594. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.04.025

Parolini, M., Pedriali, A., Binelli, A., 2013. Chemical and biomarker responses for site-specific quality assessment of the Lake Maggiore (Northern Italy). Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 5545–5557. doi:10.1007/s11356-013-1556-6

Parolini, M., Quinn, B., Binelli, A., Provini, A., 2011b. Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. Chemosphere 84, 91–100. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.02.049

Patterson, M.W.R., Ciborowski, J.J.H., Barton, D.R., 2005. The distribution and abundance of Dreissena species (*Dreissenidae*) in Lake Erie, 2002. J. Great Lakes Res. 31, 223–237. doi:10.1016/S0380-1330(05)70316-6

Pejchar, L., Mooney, H.A., 2009. Invasive species, ecosystem services and human well-being. Trends Ecol. Evol. 24, 497–504. doi:10.1016/j.tree.2009.03.016

Pelletier, M., 2008. Suivi de l'état du Saint-Laurent, La contamination des sédiments par les toxiques. Le lac Saint-Louis: confluent de deux rivières

Perfetto, S.P., Chattopadhyay, P.K., Roederer, M., 2004. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. Nat. Rev. Immunol. 4, 648–655. doi:10.1038/nri1416

Pernet, F., Tremblay, R., Comeau, L., Guderley, H., 2007. Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. J. Exp. Biol. 210, 2999–3014. doi:10.1242/jeb.006007

Perrigault, M., Dahl, S.F., Espinosa, E.P., Gambino, L., Allam, B., 2011. Effects of temperature on hard clam (*Mercenaria mercenaria*) immunity and QPX (Quahog Parasite Unknown) disease development: II. Defense parameters. J. Invertebr. Pathol. 106, 322–332. doi:10.1016/j.jip.2010.11.004

Peyer, S.M., Hermanson, J.C., Lee, C.E., 2010. Developmental plasticity of shell morphology of quagga mussels from shallow and deep-water habitats of the Great Lakes. J. Exp. Biol. 213, 2602–2609. doi:10.1242/jeb.042549

Peyer, S.M., Hermanson, J.C., Lee, C.E., 2011. Effects of shell morphology on mechanics of zebra and quagga mussel locomotion. J. Exp. Biol. 214, 2226–2236. doi:10.1242/jeb.053348

Pimentel, D., Zuniga, R., Morrison, D., 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. Ecol. Econ. 52, 273–288. doi:10.1016/j.ecolecon.2004.10.002

Pipe, R.K., 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Histochem. J. 22, 595–603. doi:10.1007/BF01072941

Pipe, R.K., Coles, J.A., 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. Fish Shellfish Immunol. 5, 581–595. doi:10.1016/S1050-4648(95)80043-3

Pollero, R.J., Huca, G., Brenner, R.R., 1985. Role of hemocytes and plasma on lipid transport in the freshwater mollusc *Diplodon delodontus*. Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol. 82, 339–343. doi:10.1016/0300-9629(85)90865-5

Prado-Alvarez, M., Romero, A., Balseiro, P., Dios, S., Novoa, B., Figueras, A., 2012. Morphological characterization and functional immune response of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) haemocytes after bacterial stimulation. Fish Shellfish Immunol. 32, 69–78. doi:10.1016/j.fsi.2011.10.019

Prasada Rao, D.G.V., Khan, M.A.Q., 2000. Zebra mussels: Enhancement of copper toxicity by high temperature and its relationship with respiration and metabolism. Water Environ. Res. 72, 175–178. doi:10.2175/106143000X137257

Pynnönen, K., 1990. Effect of acidic conditions on cadmium kinetics and electrolyte balance in the freshwater clam *Unio pictorum*. Ann. Zool. Fennici.

Quinn, B., Costello, M.J., Dorange, G., Wilson, J.G., Mothersill, C., 2009. Development of an in vitro culture method for cells and tissues from the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Cytotechnology 59, 121–134. doi:10.1007/s10616-009-9202-3

Quinn, B., Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R., 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena*

polymorpha) and their comparison with standardized toxicity tests. Chemosphere 84, 657–63. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.03.033

Rajagopal, S., van der Velde, G., van der Gaag, M., Jenner, H.A., 2005. Factors influencing the upper temperature tolerances of three mussel species in a brackish water canal: size, season and laboratory protocols. Biofouling 21, 87–97. doi:10.1080/08927010500133584

Ram, J.L., Fong, P.P., Garton, D.W., 1996. Physiological aspects of zebra mussel reproduction: maturation, spawning, and fertilization. Am. Zool. 36, 326–338. doi:10.1093/icb/36.3.326

Raven, J., Caldeira, K., Elderfield, H., Hoegh-Guldberg, O., Liss, P., Riebesell, U., Shepherd, J., Turley, C., Watson, A., 2005. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. Coral Reefs 5, 60. doi:10.1080/02688690801911598

Rebelo, M.D.F., Figueiredo, E.D.S., Mariante, R.M., Nóbrega, A., de Barros, C.M., Allodi, S., 2013. New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. PLoS One 8, e57384. doi:10.1371/journal.pone.0057384

Regoli, L., Chan, H.M., De Lafontaine, Y., 1999. Organotins in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Saint Lawrence River. J. Great Lakes Res. 25, 839–846. doi:10.1016/S0380-1330(99)70781-1

Regoli, L., Chan, H.M., De Lafontaine, Y., Mikaelian, I., 2001. Organotins in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and sediments of the Quebec City Harbour area of the St. Lawrence River. Aquat. Toxicol. 53, 115–126. doi:10.1016/S0166-445X(00)00174-0

Renault, T., 2015. Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. Fish Shellfish Immunol. 46, 88–93. doi:10.1016/j.fsi.2015.04.011

Renault, T., Xue, Q.-G., Chilmonczyk, S., 2001. Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. Fish Shellfish Immunol. 11, 269–274. doi:10.1006/fsim.2000.0312

Ricciardi, A., Whoriskey, F.G., 2004. Exotic species replacement: shifting dominance of dreissenid mussels in the Soulanges Canal, upper St. Lawrence River, Canada. J. North Am. Benthol. Soc. 23, 507–514. doi:10.1899/0887-3593(2004)023<0507:ESRSDO>2.0.CO;2

Richman, L., Somers, K., 2005. Can we use zebra and quagga mussels for biomonitoring contaminants in the Niagara River? Water. Air. Soil Pollut. 167, 155–178. doi:10.1007/s11270-005-0083-6

Rioult, D., Lebel, J.M., Le Foll, F., 2013. Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes *in vitro*. Cytotechnology 65, 749–758. doi:10.1007/s10616-013-9558-2

Rioult, D., Pasquier, J., Boulangé-Lecomte, C., Poret, A., Abbas, I., Marin, M., Minier, C., Le Foll, F., 2014. The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally

inducible in eosinophilic granulocytes. Aquat. Toxicol. 153, 98–109. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.012

Riva, C., Binelli, A., Provini, A., 2008. Evaluation of several priority pollutants in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in the largest Italian subalpine lakes. Environ. Pollut. 151, 652–662. doi:10.1016/j.envpol.2007.03.016

Roberts, S.B., Sunila, I., Wikfors, G.H., 2012. Immune response and mechanical stress susceptibility in diseased oysters, *Crassostrea virginica*. J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 182, 41–48. doi:10.1007/s00360-011-0605-z

Rocha, T.L., Gomes, T., Cardoso, C., Letendre, J., Pinheiro, J.P., Sousa, V.S., Teixeira, M.R., Bebianno, M.J., 2014. Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. Mar. Environ. Res. 101, 29–37. doi:10.1016/j.marenvres.2014.07.009

Roditi, H.A., Caraco, N.F., Jonathan, N.F.C., Caraco, N.F., 1996. Filtration of Hudson River Water by the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*). Estuaries 19, 824–832.

Roe, S.L., MacIsaac, H.J., 1997. Deepwater population structure and reproductive state of quagga mussels (*Dreissena bugensis*) in Lake Erie. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 54, 2428–2433. doi:10.1139/cjfas-54-10-2428

Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Aquat. Toxicol. 22, 81–114. doi:10.1016/0166-445X(92)90026-J

Roesijadi, G., Brubacher, L.L., Unger, M.E., Anderson, R.S., 1997. Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium *in vitro*. Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 118, 171–176. doi:10.1016/S0742-8413(97)00085-6

Roseman, E.F., Mills, E.L., Rutzke, M., Gutenmann, W.H., Lisk, D.J., 1994. Absorption of cadmium from water by North American zebra and quagga mussels (Bivalvia: Dreissenidae). Chemosphere 28, 737–743. doi:10.1016/0045-6535(94)90227-5

Rowley, T., 2012. Flow Cytometry - A Survey and the Basics. Mater. Methods 2. doi:10.13070/mm.en.2.125

Rutzke, M.A., Gutenmann, W.H., Lisk, D.J., Mills, E.L., 2000. Toxic and nutrient element concentrations in soft tissues of zebra and quagga mussels from Lakes Erie and Ontario. Chemosphere 40, 1353–1356. doi:10.1016/S0045-6535(99)00281-7

Salo, H., Dautremepuits, C., Smits, J., Brousseau, P., Fournier, M., 2005. Immune Markers in Ecotoxicology, in: Investigative Immunotoxicology. Informa Healthcare, pp. 147–161. doi:10.1201/9781420036817.ch10

Samain, J.F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Geret, F., Boutet, I., Burgeot, T., Boudry, P., 2007. Genetically based resistance to summer mortality

in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. Aquaculture 268, 227–243. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.044

Santarem, M., Robledo, J., Figueras, A., 1994. Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. Dis. Aquat. Organ. 18, 217–222. doi:10.3354/dao018217

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

Schäfer, S., Hamer, B., Treursić, B., Möhlenkamp, C., Spira, D., Korlević, M., Reifferscheid, G., Claus, E., 2012. Comparison of bioaccumulation and biomarker responses in *dreissena polymorpha* and *D. bugensis* after exposure to resuspended sediments. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 62, 614–627. doi:10.1007/s00244-011-9735-2

Schloesser, D.E.W., Nalepa, T.F., Mackie, G.L., 1996. Zebra mussel infestation of unionid Bivalves (Unionidae) in. Am. Zool. 36, 300–310. doi:10.1093/icb/36.3.300

Schloesser, D.W., Schmuckal, C., 2012. Bibliography of *Dreissena polymorpha* (Zebra Mussels) and *Dreissena rostriformis Bugensis* (Quagga Mussels): 1989 to 2011. J. Shellfish Res. 31, 1205–1263. doi:10.2983/035.031.0432

Schneeweiß, H., Renwrantz, L., 1993. Analysis of the attraction of haemocytes from *Mytilus edulis* by molecules of bacterial origin. Dev. Comp. Immunol. 17, 377–387. doi:10.1016/0145-305X(93)90029-P

Sheir, S.K., Handy, R.D., Henry, T.B., 2013. Effect of pollution history on immunological responses and organ histology in the marine mussel *Mytilus edulis* exposed to cadmium. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 64, 701–716. doi:10.1007/s00244-012-9868-y

Shi, W., Zhao, X., Han, Y., Che, Z., Chai, X., Liu, G., 2016. Ocean acidification increases cadmium accumulation in marine bivalves: a potential threat to seafood safety. Nat. Sci. Reports 6, 20197. doi:10.1038/srep20197

Smital, T., Sauerborn, R., Hackenberger, B.K., 2003. Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. Aquat. Toxicol. 65, 443–465. doi:10.1016/S0166-445X(03)00175-9

Smith, V.J., 2010. Immunology of Invertebrates: Cellular. Encycl. Life Sci. doi:10.1002/9780470015902.a0002344.pub2

Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H., 2004. Ecotoxicogenomics: The challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. Aquat. Toxicol. 67, 143–154. doi:10.1016/j.aquatox.2003.11.011

Sokolova, I.M., 2004. Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: *Ostreidae*). J. Exp. Biol. 207, 2639–2648. doi:10.1242/jeb.01054

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

Sokolova, I.M.I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. Clim. Res. 37, 181–201. doi:10.3354/cr00764

Sokolova, I., 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. ISJ 49–58.

Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. Mar. Environ. Res. 79, 1–15. doi:10.1016/j.marenvres.2012.04.003

Song, L., Wang, L., Qiu, L., Zhang, H., 2010. Bivalve immunity. In Invertebrate immunity. Springer US. 44-65

Soudant, P., Paillard, C., Choquet, G., Lambert, C., Reid, H.I., Marhic, A., Donaghy, L., Birkbeck, T.H., 2004. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (=*Tapes*, =*Ruditapes*) *philippinarum*. Aquaculture 229, 401–418. doi:10.1016/S0044-8486(03)00352-1

Soudant, P., E Chu, F.-L., Volety, A., 2013. Host-parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus species*. J. Invertebr. Pathol. 114, 196–216. doi:10.1016/j.jip.2013.06.001

Spidle, A.P., May, B., Mills, E.L., 1995. Limits to tolerance of temperature and salinity in the quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52, 2108–2119. doi:10.1139/f95-804

Spidle, A.P., Mills, E.L., May, B., 1995b. Absence of naturally occurring hybridization between the quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and the zebra mussel (*D. polymorpha*) in the lower Great Lakes. Can. J. Zool. 73, 400–403. doi:10.1139/z95-044

Stewart, T.W., Miner, J.G., Lowe, R.., 1998. Quantifying mechanisms for zebra mussel effects on benthic macroinvertebrates: organic matter production and shell-generated habitat. J. North Am. Benthol. Soc. 17, 81–94. doi:10.2307/1468053

Stoeckmann, A., 2003. Physiological energetics of Lake Erie dreissenid mussels: a basis for the displacement of *Dreissena polymorpha* by *Dreissena bugensis*. Can. J. Fish. Aquat. … 60, 126–134. doi:10.1139/f03-005

Strayer, D.L., 2009. Twenty years of zebra mussels: Lessons from the mollusk that made headlines. Front. Ecol. Environ. 7, 135–141. doi:10.1890/080020

Suárez, M.P., Alvarez, C., Molist, P., San Juan, F., 2005. Particular aspects of gonadal cycle and seasonal distribution of gametogenic stages of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the estuary of Vigo. J. Shellfish Res. 24, 531–540. doi:10.2983/0730-8000(2005)24

Sunday, J.M., Bates, A.E., Dulvy, N.K., 2012. Thermal tolerance and the global redistribution of animals. Nat. Clim. Chang. 2, 686–690. doi:10.1038/nclimate1539

Suzuki, T., Funakoshi, S., 1992. Isolation of a fibronectin-like molecule from a marine bivalve, *Pinctada fucata*, and its secretion by amebocytes. Zoolog. Sci. 541–550.

Suzuki, T., Yoshinaka, R., Mizuta, S., Funakoshi, S., Wada, K., 1991. Extracellular matrix formation by amebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*. Cell Tissue Res. 266, 75–82. doi:10.1007/BF00678713

Takahashi, K.G., Mori, K., 2000. Functional profiles of hemocytes in bio-defense process of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Tohoku J. Agric. Res. 51, 15–27.

Takatsuki, S., 1934. On the nature and function of the amoebocytes of *Ostrea elulis*. Quart. J. Micr. Sci., 76: 379-431.

Tame, A., Yoshida, T., Ohishi, K., Maruyama, T., 2015. Phagocytic activities of hemocytes from the deep-sea symbiotic mussels *Bathymodiolus japonicus*, *B. platifrons*, and *B. septemdierum*. Fish Shellfish Immunol. 45, 146–156. doi:10.1016/j.fsi.2015.03.020

Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Muntau, H., van Leeuwen, H.P., Lobinski, R., 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). Pure Appl. Chem. 72, 1453–1470. doi:10.1351/pac200072081453

Terahara, K., Takahashi, K.G., Nakamura, A., Osada, M., Yoda, M., Hiroi, T., Hirasawa, M., Mori, K., 2006. Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster "*Crassostrea gigas*". Dev. Comp. Immunol. 30, 667–83. doi:10.1016/j.dci.2005.09.009

Torreilles, J., Guérin, M. C., Roch, P., 1996. Reactive oxygen species and defense mechanisms in marine bivalves. Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie, 319(3), 209-218.

Torreilles, J., Guérin, M.-C., Roch, P., 1999. Modified Alsever's solution is not a good medium for reactive oxygen metabolite study in bivalves. Fish Shellfish Immunol. 9, 65–69.

Travers, M.-A., Mirella da Silva, P., Le Goïc, N., Marie, D., Donval, A., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. Fish Shellfish Immunol. 24, 400–11. doi:10.1016/j.fsi.2007.10.001

Tripp, M.R., 1992. Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. J. Invertebr. Pathol. 59, 222–227.

UNEP, 2007. Report of the Persistent Organic Pollutants Review Committee on the work of its third meeting. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants Persistent Organic Pollutants Review Committee.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6

Veldhuizen-Tsoerkan, M.B., Holwerda, D.A., Zandee, D.I., 1991. Anoxic survival time and metabolic parameters as stress indices in sea mussels exposed to cadmium or polychlorinated biphenyls. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20, 259–265. doi:10.1007/BF01055913

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Mancinelli, G., Accomando, R., Smaal, A.C., Orunesu, M., 1995. Stress on stress response: A simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. Mar. Environ. Res. 39, 245–248. doi:10.1016/0141-1136(94)00075-Z

Viarengo, A., Nicotera, P., 1991. Possible role of ca2+ in heavy metal cytotoxicity. Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol. 100, 81–84. doi:10.1016/0742-8413(91)90127-F

Vindimian, E., 2012. MSExcel Macro Regtox.7.0.6 Freely Available from Eric Vindimian. IRSTEA, France http://www.normalesup.org/~vindimian/fr index.html.

Vinogradov, G.A., Smirnova, N.F., Sokolov, V.A., Bruznitsky, A.A., 1993. Influence of chemical composition of the water on the mollusk *Dreissena polymorpha*. In Zebra mussels. Biology, impacts and control. Edited by T.F. Nalepa and D.W. Schloesser. Lewis Publishers, Ann Arbor, Mich. pp. 283–294.

Voets, J., Redeker, E.S., Blust, R., Bervoets, L., 2009. Differences in metal sequestration between zebra mussels from clean and polluted field locations. Aquat. Toxicol. 93, 53–60. doi:10.1016/j.aquatox.2009.03.006

Voroshilova, I.S., Artamonova, V.S., Makhrov, a. a., Slyn'ko, Y. V., 2010. Natural hybridization of two mussel species *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) and *Dreissena bugensis* (Andrusov, 1897). Biol. Bull. 37, 542–547. doi:10.1134/S1062359010050158

Wang, H., Song, L., Li, C., Zhao, J., Zhang, H., Ni, D., Xu, W., 2007. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Mol. Immunol. 44, 722–731. doi:10.1016/j.molimm.2006.04.015

Wang, J., Chuang, C.-Y., Wang, W.-X., 2005. Metal and Oxygen Uptake in the Green Mussel *Perna Viridis* Under Different Metabolic Conditions. Environ. Toxicol. Chem. 24, 2657–2664.

Wang, L., Huang, M., Zhang, H., Song, L., 2011. The immune role of C-type lectins in molluscs. Invertebr. Surviv. J. 8, 241–246.

Wang, L.-S., Wang, L., Wang, L., Wang, G., Li, Z.-H., Wang, J.-J., 2009. Effect of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on the wheat (*Triticum aestivum L*.) seedlings. Environ. Toxicol. 24, 296–303. doi:10.1002/tox

Wang, Y., Hu, M., Chiang, M.W.L., Shin, P.K.S., Cheung, S.G., 2012b. Characterization of subpopulations and immune-related parameters of hemocytes in the green-lipped mussel *Perna viridis*. Fish Shellfish Immunol. 32, 381–390. doi:10.1016/j.fsi.2011.08.024

Watkins, J.M., Dermott, R., Lozano, S.J., Mills, E.L., Rudstam, L.G., Scharold, J. V, 2007. Evidence for remote effects of dreissenid mussels on the Amphipod Diporeia : Analysis of Lake Ontario benthic surveys , 1972 – 2003. J. Great Lakes Res. 33, 642–657. doi:10.3394/0380-1330(2007)33[642:EFREOD]2.0.CO;2

Wikfors, G.H., Alix, J.H., 2014. Granular hemocytes are phagocytic, but agranular hemocytes are not, in the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Invertebr. Immun. 1, 15–21. doi:10.2478/invim-2014-0001

Wilson, K.A., Howell, E.T., Jackson, D.A., 2006. Replacement of zebra mussels by Quagga mussels in the Canadian nearshore of Lake Ontario: the importance of substrate, round goby abundance, and upwelling frequency. J. Great Lakes Res. 32, 11–28. doi:10.3394/0380-1330(2006)32[11:ROZMBQ]2.0.CO;2

Wootton, E., Dyrynda, E., Ratcliffe, N., 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. doi:10.1016/S1050-4648(02)00161-4

Xie, Y., Hu, B., Wen, C., Mu, S., 2011. Morphology and phagocytic ability of hemocytes from *Cristaria plicata*. Aquaculture 310, 245–251. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.09.034

Xu, Q. qing, Guo, L. gen, Xie, J., Zhao, C., 2011. Relationship between quality of pearl cultured in the triangle mussel *Hyriopsis cumingii* of different ages and its immune mechanism. Aquaculture 315, 196–200. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.02.033

Xu, W., Faisal, M., 2010. Defensin of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Molecular structure, *in vitro* expression, antimicrobial activity, and potential functions. Mol. Immunol. 47, 2138–2147. doi:10.1016/j.molimm.2010.01.025

Xue, Q.G., Waldrop, G.L., Schey, K.L., Itoh, N., Ogawa, M., Cooper, R.K., Losso, J.N., La Peyre, J.F., 2006. A novel slow-tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (*Crassostrea virginica*) plasma inhibits perkinsin, the major extracellular protease of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*. Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 145, 16–26. doi:10.1016/j.cbpb.2006.05.010

Xue, Q., Hellberg, M.E., Schey, K.L., Itoh, N., Eytan, R.I., Cooper, R.K., La Peyre, J.F., 2010. A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. BMC Evol. Biol. 10, 213. doi:10.1186/1471-2148-10-213

Xue, Q.-G., Renault, T., Chilmonczyk, S., 2001. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. Fish Shellfish Immunol. 11, 557–567. doi:10.1006/fsim.2001.0335

Xue, Q.-G., Schey, K.L., Volety, A.K., Chu, F.-L.E., La Peyre, J.F., 2004. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 139, 11–25. doi:10.1016/j.cbpc.2004.05.011

Yang, H.S., Hong, H.K., Donaghy, L., Noh, C.H., Park, H.S., Kim, D.S., Choi, K.S., 2015. Morphology and Immune-related activities of hemocytes of the mussel *Mytilus coruscus* (Gould, 1861) from East Sea of Korea. Ocean Sci. J. 50, 77–85. doi:10.1007/s12601-015-0006-4

Yao, C.-L., Somero, G.N., 2012. The impact of acute temperature stress on hemocytes of invasive and native mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*): DNA damage, membrane integrity, apoptosis and signaling pathways. J. Exp. Biol. 215, 4267–77. doi:10.1242/jeb.073577

Young, M.K., Park, K.I., Choi, K.S., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., Cho, M., 2006. Lectin from the manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. J. Biol. Chem. 281, 26854–26864. doi:10.1074/jbc.M601251200

Yu, J.H., Song, J.H., Choi, M.C., Park, S.W., 2009. Effects of water temperature change on immune function in surf clams, *Mactra veneriformis* (Bivalvia: Mactridae). J. Invertebr. Pathol. 102, 30–35. doi:10.1016/j.jip.2009.06.002

Zhang, Z., Li, X., Vandepeer, M., Zhao, W., 2006. Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture 256, 502–509. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.02.003

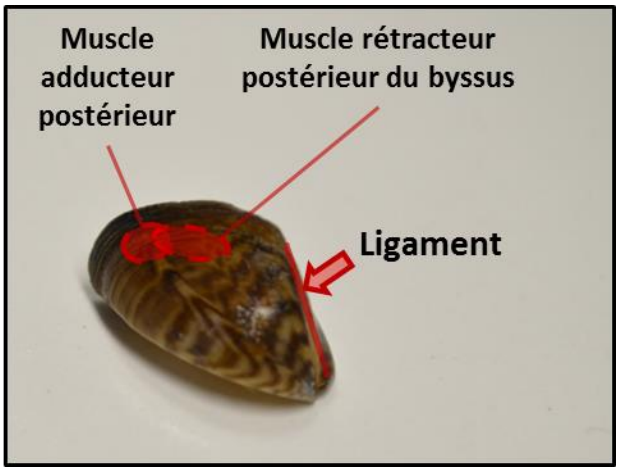
Zhulidov, A. V., Kozhara, A. V., Scherbina, G.H., Nalepa, T.F., Protasov, A., Afanasiev, S.A., Pryanichnikova, E.G., Zhulidov, D.A., Gurtovaya, T.Y., Pavlov, D.F., 2010. Invasion history, distribution, and relative abundances of *Dreissena bugensis* in the old world: A synthesis of data. Biol. Invasions 12, 1923–1940. doi:10.1007/s10530-009-9641-y

Zhulidov, A. V., Pavlov, D.F., Nalepa, T.F., Scherbina, G.H., Zhulidov, D.A., Gurtovaya, T.Y., 2004. Relative distributions of *Dreissena bugensis* and *Dreissena polymorpha* in the lower Don River system, Russia. Int. Rev. Hydrobiol. 89, 326–333. doi:10.1002/iroh.200310727

Annexes

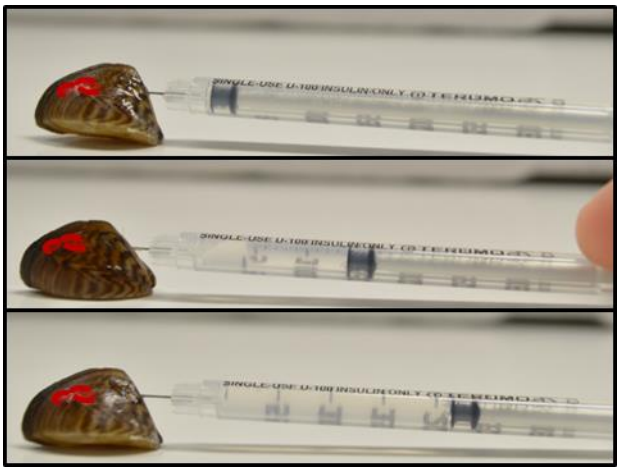
<u>ANNEXE 1</u> : Protocoles analytiques des activités hémocytaires chez la dreissène

<u>Prélèvement hémocytaire</u>



L'hémolymphe est prélevée au niveau du muscle adducteur postérieur et du muscle rétracteur postérieur du byssus avec une seringue de 0,3 à 1 mL 29G.

Une légère incision est réalisée dans la partie dorsale postérieure de l'animal au niveau du ligament.



L'aiguille doit venir piquer le muscle (qui est plus dur que le reste de l'animal).

/!\ : ***Ne pas faire un vide trop important dans la seringue pour aspirer l'hémolymphe.***

Placer le contenu de la seringue dans un tube eppendorf 1,5mL

/!\ : ***Ne pas expulser l'hémolymphe de la seringue trop rapidement pour éviter d'abimer ou stresser les cellules***

Test de viabilité

Réactifs	Fournisseur	Ref.
Propidium iodide solution solution (1.0 mg/ml in water)	Sigma	P4864-10ML
L15-15% + P/S + Glu		

- Ajout de **2,5µL** Solution Stock d'IP dans un Vtotal L15-15% + P/S + Glu de 250 µL
  (dilution finale 1/100e = 10 µg/mL)
- Lecture après ajout du réactif (pas d'effet du temps d'incubation sur les résultats)
- Acquisition de 10 000 évènements dans la région cellulaire

Réglages FACScalibur

FSC : E-1
SSC : 240V
FL2 : 400V

Test de phagocytose

***!** La taille des billes à l'achat est nominale ! La taille réelle est différente de la taille de référence produit ce qui peut influencer la réponse de phagocytose.*

Réactifs	Fournisseur	Ref.
Fluoresbrite® Fluorescent Microspheres 2.00µm particles packaged as 2.5% aqueous suspension	PolyScience	09847-5
L15-15% + P/S + Glu		

Calcul concentration de billes en solution:

Nombre de billes / mL = $\frac{6W \times 10^{12}}{\rho \times \pi \times \emptyset}$

W = grammes de polymère par mL de latex (0,025g pour 2,5% de latex)
Ø = diamètre en µm de la bille de latex
ρ = densité du polymère en g/mL (1,05 g/mL)
Pour des billes de 2,157 µm : [billes] = 4,533.109 billes/mL

- Mettre en présence des hémocytes les microbilles de latex avec un ratio de 100 billes par hémocyte.

Pour 100 000 cellules calculer le volume nécessaire pour obtenir 10^7 billes :

- *Pour avoir 10^7 billes de 2,157 µm, V= 2,2 µL*
- *Pour avoir 10^7 billes de 1,88 µm, V= 1,4 µL*
- Incubation 18h minutes à 16°C et à l'obscurité

Acquisition de 10 000 évènements dans la région d'intérêt
Lecture en FL-1

Réglages FACScalibur

FSC: E-1
SSC: 240V
FL-1: 230V (billes 2µm) il faut augmenter le voltage pour des billes de plus petite taille et inversement quand la taille de bille augmente.

Test d'activité oxydative

Réactifs	Fournisseur	Ref.
DCFH-DA : 2′,7′-Dichlorofluorescin diacetate ≥97%	Sigma	D6883-50MG
L15-15% + P/S + Glu		

Préparation de la solution de DCFH-DA :

Solution Stock à 5mM dans éthanol : PM = 487,29 | 5 mM = 2,436 g/L
Solution de travail : 0,5 mM = Dilution 1/10e de la solution stock dans le L15-15% + P/S + Glu

Mesure de l'activité oxydative basale :

- Ajout de **5 µL** Solution de travail de DCFH-DA dans un Vtotal L15-15% + P/S + Glu de 250 µL (dilution finale 1/50e = 10 µM)
- Incubation 120 minutes à 16°C et à l'obscurité

Réglages FACScalibur

FSC: E-1
SSC: 240V
FL-1: 380V

Acquisition de 10 000 évènements dans la région d'intérêt
Lecture en FL-1

Marquage du système lysosomal

Réactifs	Fournisseur	Ref.
Lysotracker Red DND-99	Invitrogen	L-7528
L15-15% + P/S + Glu		

Préparation de la solution de Lysotracker :

Solution Stock à 1000 µM

Solution de travail : 100µM : dilution 1/10e de la solution stock = 100µM

- Ajout de **2,5µL** Solution de travail de Lysotracker dans un Vtotal L15-15% + P/S + Glu de 250 µL [finale = 1µM]
- Incubation 15 minutes à 16°C et à l'obscurité

Réglages FACScalibur

FSC: E-1
SSC: 240V
FL-2: 350V

Acquisition de 10 000 évènements dans la région d'intérêt
Lecture en FL-2

Marquage de l'activité mitochondriale

Réactifs	Fournisseur	Ref.
Mitotracker Red CMXRos	Invitrogen	M-7512
L15-15% + P/S + Glu		

Préparation de la solution de Mitotracker :

Solution Stock à 1mM : ajout de 94,07µL de DMSO à 50 µg de poudre

Solution de travail : dilution 1/200e de la solution stock = 5 µM (5µL solution stock QSP 1mL milieu)

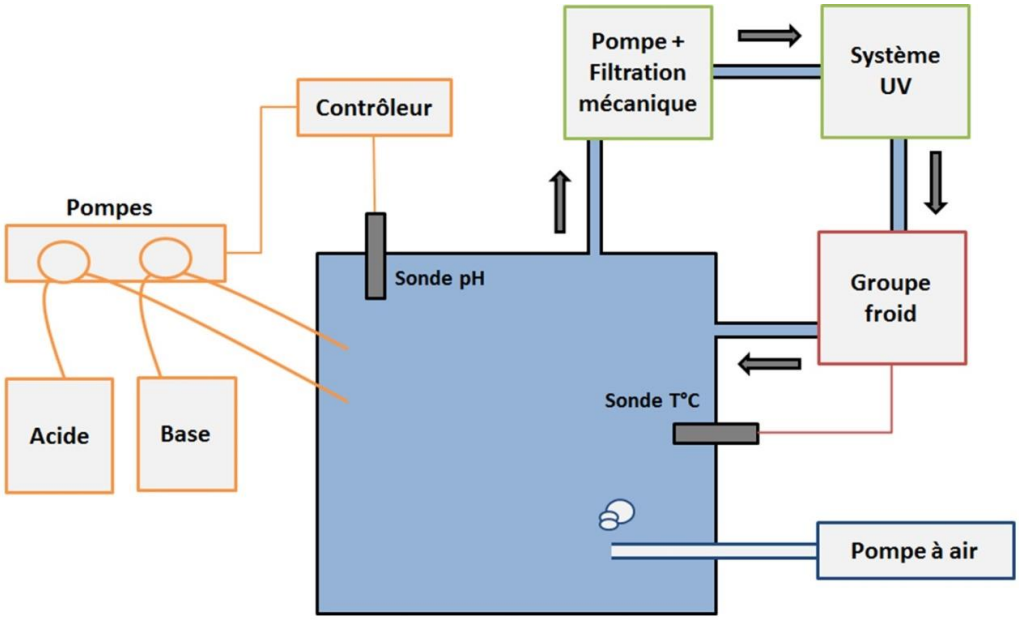
- Ajout de **2,5µL** Solution de travail de Mitotracker dans un Vtotal L15-15% + P/S + Glu de 250 µL [finale = 50nM]
- Incubation 15 minutes à 16°C et à l'obscurité

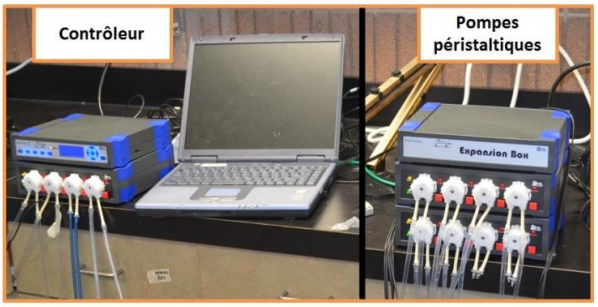
Réglages FACScalibur

FSC: E-1
SSC: 240V
FL-2: 450V

Acquisition de 10 000 évènements dans la région d'intérêt
Lecture en FL-2

<u>Annexe 2</u> : Système expérimental du Biodôme de Montréal pour le maintien des moules zébrées et système de régulation de la température et du pH. Encadrés vert : système de filtration et stérilisation de l'eau. Encadrés rouge : système de régulation de la température. Encadrés orange : système de régulation du pH, encadré bleu : système d'oxygénation.





Caractérisations structurale et fonctionnelle des populations hémocytaires de la moule zébrée (*Dreissena* sp.) en vue de leur utilisation en évaluation du risque écotoxicologique.

Résumé

L'extension des activités humaines est responsable du rejet de molécules et de perturbations climatiques pouvant affecter la physiologie des organismes aquatiques. La moule zébrée possède des caractéristiques biologiques faisant d'elle une espèce intéressante en surveillance environnementale. Chez cet organisme, les hémocytes constituent une cible privilégiée pour la mise en place d'une approche multi-biomarqueurs. En effet, ces cellules à fonctionnalités multiples sont impliquées dans les grandes fonctions physiologiques de l'espèce et la régulation de l'homéostasie des individus. L'objectif de ce travail est de développer les outils analytiques permettant d'étudier les réponses hémocytaires de la moule zébrée. Les expérimentations menées ont permis de caractériser la structure des populations hémocytaires ainsi que leurs fonctionnalités propres en lien avec le processus de phagocytose. L'utilisation de ces biomarqueurs dans divers contextes indique une forte adaptabilité de l'espèce aux conditions environnementales. Les résultats montrent l'intérêt d'analyser les activités hémocytaires à l'échelle des sous populations comparativement à l'approche globale ne tenant pas compte de la diversité cellulaire. Il a été observé que certains facteurs comme le statut reproducteur ou l'espèce échantillonnée (*D. polymorpha vs D. bugensis*) constituent des facteurs de confusion importants. Il ressort également un positionnement fort du test de phagocytose en tant que marqueur de sensibilité aux contaminants. Ce travail constitue un ensemble de données voué à être utilisé dans des contextes multiples aussi bien en écotoxicologie qu'en écophysiologie.

Mots clefs : Moule zébrée, hémocytes, phagocytose, biomarqueurs, écotoxicologie

Structural and functional characterization of hemocyte populations of zebra mussels (*Dreissena* sp.) for use in ecotoxicological risk assessment.

Abstract

Extension of human activities is responsible of molecule releases and climate changes that may affect physiology of aquatic organisms. The zebra mussel has biological traits making it an interesting species for environmental monitoring. In this organism, hemocyte cells constitute an interesting target to develop a multi-biomarker approach. These cells possess multiple functionalities and are involved in all major physiological functions of the species and in homeostasis regulation. The objective of this work was to develop analytical tools to study hemocyte responses of zebra mussels. Experiments allowed characterizing structure of hemocyte populations and their functionalities linked with phagocytosis process. Use of these biomarkers in various contexts indicated an important adaptation capacity of the species to environmental conditions. Results highlighted interest to analyze hemocyte activities at sub-population scale comparatively to global approach that does not consider hemocyte diversity. It was demonstrated that parameters such as reproductive status or sampled species (*D. polymorpha vs D. bugensis*) constitute important confounding factors. Studies also demonstrated a strong positioning of phagocytosis assay as a sensitive marker to contaminants. This work constitutes a data set destined to be used in multiple contexts such as ecotoxicology or ecophysiology.

Keywords: Zebra mussel, hemocytes, phagocytosis, biomarkers, ecotoxicology

---

UMR-I 02 SEBIO
UFR Sciences Exactes et Naturelles, Moulin de la Housse
BP 1039, 51687 Reims Cedex 02, France

INRS – Institut Armand-Frappier
531 Boulevard des Prairies
H7V 1B7 Laval (Québec), Canada