

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

**EXPOSITION DE LA MOULE BLEUE (*MYTILUS EDULIS*) À DEUX SOUCHES
BACTÉRIENNES D'ORIGINE FÉCALE (*ESCHERICHIA COLI* ET
ENTEROCOCCUS FAECALIS) ET À UNE SOUCHE ENDÉMIQUE (*VIBRIO
SPLENDIDUS*): EFFETS SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en Océanographie
en vue de l'obtention du grade maître ès Sciences

PAR

© ISABELLE BOILY

Février 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

Composition du jury :

Émilien Pelletier, président du jury, Université du Québec à Rimouski

Sophie Gauthier-Clerc, directrice de recherche, Université du Québec à Rimouski

Karine Lemarchand, codirectrice de recherche, Université du Québec à Rimouski

Ahmed Siah, examinateur externe, BC Center for aquatic health sciences

Dépôt initial le 19 décembre 2011

Dépôt final le 8 février 2013

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice Sophie Gauthier-Clerc pour sa grande disponibilité, sa compréhension et pour tous les conseils qu'elle m'a donnés afin de m'aider lors de ma maîtrise et aussi dans ma carrière future. Elle m'a rendue plus critique, plus autonome et m'a donnée un bagage de connaissances qui m'aidera tout au long de ma carrière. Merci. J'aimerais également remercier ma codirectrice Karine Lemarchand pour sa disponibilité et pour m'avoir maintenue sur la bonne voie tout au long de ma maîtrise. Je la remercie aussi d'avoir accepté de manipuler des organismes de plus d'une cellule afin de m'aider durant mes échantillonnages. Ce fut grandement apprécié.

Je souhaite également remercier Émilien Pelletier et Ahmed Siah d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Je remercie également le CRSNG pour son soutien financier.

Je tiens aussi à remercier tous ceux qui m'ont aidée durant mon projet, Karine Lemarchand, Amélie Jauvin, Romy Ricci, et Geneviève Côté. Merci à Michel Fournier et Nicolas Toupoint grâce à qui j'ai pu avoir des moules. Merci à Ahmed Siah de m'avoir fourni une souche de *V. splendidus* et à l'hôpital de Rimouski pour la souche de *E.coli*. Merci aussi à Jocelyne Pellerin et Réjean Tremblay pour leurs conseils et pour m'avoir permis de travailler dans leur laboratoire et à tous les autres qui ont contribué à mon projet, Bertrand Genard, Pierre Rioux, le personnel de Nutrocéan et de la station aquacole de Pointe-au-Père.

Je remercie finalement ma famille et mon chum, Rémi, pour m'avoir soutenue tout au long ma maîtrise et ce, autant durant les hauts que durant les bas.

RÉSUMÉ

Les environnements aquatiques sont naturellement habités par plusieurs espèces bactériennes. Cependant, l'augmentation de l'urbanisation des côtes estuariennes mène à l'introduction de bactéries exogènes (e.g. bactéries fécales *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*) dans les eaux côtières. En tant qu'organismes filtreurs, les bivalves vivant dans ces milieux côtiers peuvent accumuler une grande quantité de bactéries, incluant des bactéries indigènes et exogènes. Présentement, la plupart des recherches effectuées sur l'interaction des bactéries avec les bivalves se concentrent sur les effets des bactéries pathogènes en présence ou non d'autres stressseurs (par exemple, les polluants chimiques) sur la physiologie ou l'immunité des espèces commerciales. *Mytilus edulis*, est fréquemment utilisée comme espèce sentinelle en écotoxicologie mais est également une espèce commerciale importante au Québec. Le but de cette étude est de mesurer les effets d'une exposition ponctuelle à *Escherichia coli* et à *Enterococcus faecalis* sur son immunocompétence puisque la présence de ces bactéries exogènes pourrait moduler la réponse immunitaire de la moule bleue parfois affectée lorsqu'il y a présence de stressseurs immunosuppresseurs (contaminants chimiques, etc.). Nous avons comparé les effets de ces challenges bactériens aux effets d'une exposition à une espèce bactérienne indigène aux eaux côtières, *Vibrio splendidus*, qui est reconnue comme n'ayant aucun effet sur l'immunité de la moule bleue. Les trois challenges bactériens ont été réalisés *in vivo* en utilisant des concentrations bactériennes représentatives des concentrations retrouvées dans les environnements côtiers (de 10^3 à 10^5 bactéries mL^{-1}). Ils ont été menés en septembre et décembre, afin d'avoir des conditions de température différentes et une condition physiologique différente pour les moules. La réponse immunitaire de *Mytilus edulis* a été déterminée 24 h et 48 h après les challenges bactériens en se basant sur des paramètres de l'immunité cellulaire (abondance des hémocytes, viabilité des cellules, production de NO_x et de ROS et phagocytose) et humorale (enzymes hydrolytiques). Nos résultats démontrent qu'à des concentrations bactériennes représentatives de celles qui sont retrouvées dans l'environnement de manière périodique suite à un déversement d'eaux usées, les bactéries exogènes *E. coli* et *E. faecalis* n'ont pas d'effets sur l'immunocompétence de *M. edulis* et

ce, peu importe la période durant laquelle le challenge a eu lieu. Le fait qu'aucune variation de l'immunité n'ait été observée 24 et 48 heures après les infections suggère que les moules ont été capables de se défendre contre ces bactéries sans que cela n'affecte à long terme leur système immunitaire. En conclusion, la contamination ponctuelle des eaux côtières par des bactéries fécales ne représente pas une menace additionnelle pour l'immunocompétence de *M. edulis* en comparaison avec d'autres stressseurs anthropiques tels que les contaminants chimiques.

ABSTRACT

Many bacterial species are natural inhabitants of aquatic environments. However, in estuarine coastal watersheds, the rapid increase of urbanization and the intensification of anthropogenic use of the watershed could lead to the introduction of exogenous bacteria (e.g. fecal bacteria such as *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*) in coastal waters. Filter feeding bivalves living in these coastal areas can accumulate a high number of bacteria, including indigenous and exogenous species. Presently, most investigations dealing with the interaction of bacteria and bivalves focus on the effects of bacterial pathogens alone or their interactive effects with other stressors, like chemical pollutants, on the physiology or the immune capacity of commercial species (e.g. oyster). Since *Mytilus edulis* is widely used as a sentinel species in ecotoxicology, the aim of this study was to assess the effect of its potentials exposure toward *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* on its immune defenses. For this purpose, we have compared the effect of such a bacterial challenge with the effect of an exposure toward *Vibrio splendidus* which is considered as an indigenous *Mytilus edulis* species of coastal estuarine waters. The three bacterial challenges were realized *in vivo*, using bacterial concentrations that are representative of the environment loads (10^3 to 10^5 cells ml⁻¹) and conducted in September and in December. The immune response of *Mytilus edulis* was determined after 24 h and 48 h of post-challenge on the basis of both cellular (total haemocytes count, cell viability, phagocytosis, production of NO_x and ROS) and humoral (hydrolytic enzymes) parameters. Our results demonstrated no inhibitory nor inductive effect of the bacterial challenges on the mussels' immune responses, whatever the bacterial strain, its concentration and the period of the challenge. In our experimental conditions, the presence of faecal bacteria in coastal waters does not represent an additional threat for immune competency. Those results permit also a better understanding of the immune reaction of *M. edulis* in response to environmental stresses in experimental conditions as representative as possible of environmental conditions.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	VII
RÉSUMÉ.....	IX
ABSTRACT.....	XI
TABLE DES MATIÈRES.....	XIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES FIGURES.....	XIX
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES ACCRONYMES.....	XXI
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1. EXPOSURE OF A SENTINEL SPECIES (<i>MYTILUS EDULIS</i>) TO FECAL BACTERIA IN COASTAL WATERS: EFFECT ON THE IMMUNE SYSTEM.....	11
ABSTRACT.....	11
1.1 INTRODUCTION.....	13
1.2 MATERIAL AND METHODS.....	16
1.3 RESULTS.....	21
1.4 DISCUSSION.....	38
1.5 CONCLUSION.....	41
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	43
RÉFÉRENCES.....	47

LISTE DES TABLEAUX^[Bc1]

Table 1: Four ways ANOVAs of the effect of time (24 h and 48 h), treatment (non-injected, unchallenged, 10^2 , 10^3 and 10^4 cfu injected), month (September and December) and the strain (<i>V. splendidus</i> , <i>E. coli</i> and <i>E. faecalis</i>) and their interaction on cellular immune parameters.....	25
Table 2: Three ways ANOVAs of the effect of time (24 h and 48 h), traitement (non-injected, unchallenged, 10^2 , 10^3 and 10^4 cfu injected) and the strain (<i>V. splendidus</i> , <i>E. coli</i> and <i>E. faecalis</i>) and their interaction on the ROS production in September and December.....	26
Table 3: Scheirer-Ray-Hare test and Four ways ANOVAs of the effect time (24 h and 48 h), treatment (non-injected, unchallenged, 10^2 , 10^3 and 10^4 cfu injected), month (September and December) and the strain (<i>V. splendidus</i> , <i>E. coli</i> and <i>E. faecalis</i>) and their interaction on humoral immune parameters.....	27
Table 4: Parameters of cellular immunity: viability of haemocytes, abundance of haemocytes, phagocytic capacity, ROS production and NO_x production 24 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in September with <i>Vibrio splendidus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Escherichia coli</i> . Values are mean \pm SD (N=3).....	28
Table 5. Parameters of cellular immunity: viability of haemocytes, abundance of haemocytes, phagocytic capacity, ROS production and NO_x production 24 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in December with <i>Vibrio splendidus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Escherichia coli</i> . Values are mean \pm SD (N=3).....	29

Table 6. Parameters of cellular immunity: viability of haemocytes, abundance of haemocytes, phagocytic capacity, ROS production and NO _x production 48 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in September with <i>Vibrio splendidus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Escherichia coli</i> . Values are mean ± SD (N=3).	30
Table 7. Parameters of cellular immunity: viability of haemocytes, abundance of haemocytes, phagocytic capacity, ROS production and NO _x production 48 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in December with <i>Vibrio splendidus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Escherichia coli</i> . Values are mean ± SD (N=3).	31
Table 8. Parameters of humoral immunity: L-leucine-aminopeptidase, proPhenoloxydase-like, acid phosphatase and total proteins 24 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in September with <i>Vibrio splendidus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Escherichia coli</i> . Values are means ± SD (N=3).	32
Table 9. Parameters of humoral immunity: L-leucine-aminopeptidase, proPhenoloxydase-like, acid phosphatase and total proteins 24 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in December with <i>Vibrio splendidus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Escherichia coli</i> . Values are means ± SD (N=3).	33
Table 10. Parameters of humoral immunity: L-leucine-aminopeptidase, proPhenoloxydase-like, acid phosphatase and total proteins 48 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in September with <i>Vibrio splendidus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Escherichia coli</i> . Values are means ± SD (N=3).	34
Table 11. Parameters of humoral immunity: L-leucine-aminopeptidase, proPhenoloxydase-like, acid phosphatase and total proteins 48 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in December with <i>Vibrio splendidus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Escherichia coli</i> . Values are means ± SD (N=3).	35

[LISTE DES FIGURES]_[Bc2]

Figure 1. Différents types d'hémocytes chez <i>M. edulis</i> . Images tirées de Le Foll et al., (2010).....	3
Figure 2. Membrane cellulaire d'une bactérie a) Gram-négative et b) Gram- positive.	4
Figure 3. Schéma illustrant l'immunité chez la moule bleue.....	7

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES ACCRONYMES

AMPs: Peptides anti-microbiens

AP: Acid Phosphatase

A.U.: Arbitrary Unit

DAF-FM: 4-amino-5-methylamino-2', 7' Difluofluorescein diacetate

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns

DCF-DA: 5 (6) carboxy-2',7'-dichlorofluorescein-diacetate

LAP: L-leucine-aminopeptidase

LPS: Lipopolysaccharide

LTA: lipoteichoic acid

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NO: Monoxyde d'azote

NO₂⁻: Nitrites

NO₃: Nitrates

NO_x: Oxydes d'azote

PNPP: 4-nitrophenylphosphate

ProPO: proPhenoloxydase

ROS: reactive oxygen species

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La moule bleue

La moule est présente sur toutes les zones côtières du monde, spécialement dans les zones intertidales. Elle est sessile et s'accroche sur des substrats durs. La moule a un mode d'alimentation suspensivore par filtration. À 8°C, elle peut filtrer jusqu'à cinquante litres d'eau par jour (Tremblay *et al.*, 2004). Elle se nourrit de phytoplancton, de débris organiques et de bactéries. Sa sédentarité et son mode d'alimentation par filtration font en sorte que la moule accumule les différents contaminants et les bactéries qui sont présents dans l'eau ou sur les particules filtrées. Ces particularités à accumuler les contaminants et les bactéries présents dans son environnement en font un organisme sentinelle largement utilisé lors d'études écotoxicologiques (Bayne, 1976; ROPME, 2010; Roslev *et al.*, 2009).

Les bactéries des eaux côtières

Les parcs mytilicoles sont situés dans les zones côtières, ce qui peut entraîner les moules à être exposées à des bactéries dont la source peut être naturelle ou anthropique, comme la décharge d'eaux usées dans l'environnement par manque d'installations d'épuration ou suite au lessivage du bassin versant lors des fortes précipitations. La concentration bactérienne totale dans les milieux côtiers peut varier entre 10^5 mL⁻¹ et 10^6 mL⁻¹ bactéries (Jacquet *et al.*, 1998; Li & Dickie, 2003). Les rejets d'eaux usées dans l'environnement marin introduisent des bactéries non indigènes au milieu marin (Garrido-Pérez *et al.*, 2008; Wells, 2003). Ces bactéries sont généralement associées au tube digestif des animaux et des humains (*e.g.* *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*). Les plus fréquemment présentes sont les entérobactéries telles qu'*Escherichia coli* et les entérocoques du groupe D, aussi appelés entérocoques fécaux, tels qu'*Enterococcus faecalis*. Ces bactéries sont d'ailleurs utilisées comme indicateurs de pollution des eaux par des matières d'origine fécale (Roslev *et al.*, 2009; Poté *et al.*, 2009).

Parmi les bactéries indigènes et exogènes présentes en zones côtières, certaines sont potentiellement virulentes pour les bivalves et peuvent présenter un risque pour la santé

humaine, comme par exemple certaines souches du genre *Vibrio* (ASPGC-PHAC., 2011). La plupart des bactéries du genre *Vibrio* sont opportunistes, c'est-à-dire qu'elles seront non pathogènes pour un organisme jusqu'à ce que leur nombre soit suffisant pour contrer ses défenses immunitaires ou jusqu'à ce que celles-ci soient diminuées. C'est alors qu'elles expriment leur potentiel pathogène. Chez les bivalves, ces bactéries sont associées à 20% des maladies causées par des bactéries (Garay *et al.*, 1985; Lane & Birkbeck, 2000; Potasman *et al.*, 2002; Pruzzo *et al.*, 2005). Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bactéries largement répandues dans les environnements marins côtiers où leur concentration peut atteindre 10^3 mL⁻¹. Alors que le potentiel pathogène de certaines souches de bactéries indigènes aux environnements côtiers est bien connu, les effets des bactéries exogènes sur la santé des moules sont moins bien documentés.

Le système immunitaire des bivalves

Le système immunitaire de la moule bleue est constitué de défenses innées, comprenant les défenses cellulaires et humorales (Seo *et al.*, 2005). L'immunité cellulaire est assurée par les hémocytes. Chez les bivalves, les hémocytes sont constitués de deux principaux types de cellules : les granulocytes et les hyalinocytes, identifiés selon leur taille, leur forme et leur contenu en granules. Les granulocytes sont des cellules au cytoplasme bien développé contenant de nombreuses granules qui ont une taille d'environ 10 μm (Le Foll *et al.* 2010). Les hyalinocytes sont des cellules sans granules qui sont généralement plus petites que les granulocytes (Auffret, 1988), comme il est possible de l'observer à la figure 1. Leur taille fait entre 7 μm et 10 μm (Le Foll *et al.* 2010). Les hyalinocytes, bien que morphologiquement hétérogènes, se divisent également en trois catégories: les cellules «*blast-like*» ayant un noyau central sphérique ou ovoïde entouré d'un cytoplasme basophile contenant peu d'organelles, les hyalinocytes «*macrophage-like*» contenant un cytoplasme basophile et les hyalinocytes, ayant un noyau ovoïde plus gros et de forme irrégulière entouré d'un cytoplasme contenant plusieurs organelles (Hine, 1999). Les granulocytes sont eux aussi hétérogènes selon la présence ou non d'enzymes lysosomales, de phenoloxydases, d'enzymes antioxydantes, de lectines et de leur capacité

phagocytaire. Ils peuvent aussi être divisés en deux groupes, les granulocytes éosinophiles et les granulocytes basophiles qui assureraient, en majeure partie, la phagocytose (Hine, 1999; Le Foll *et al.*, 2010; Pipe, 1990).

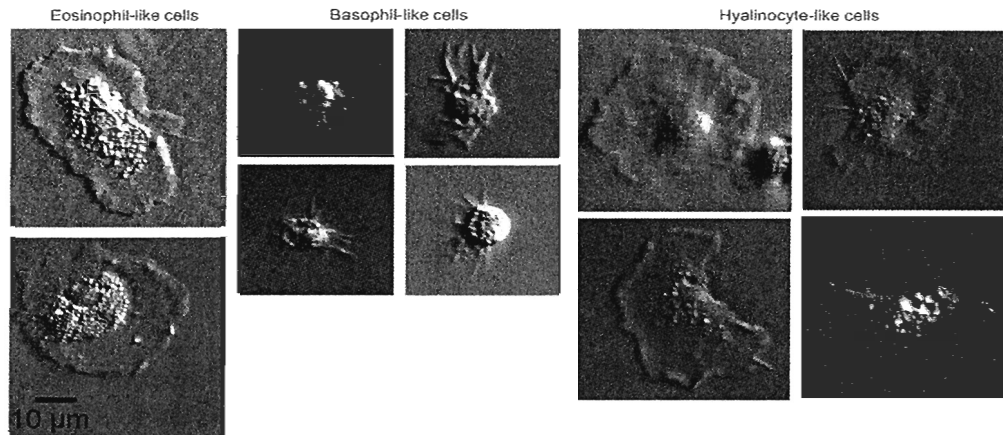


Figure 1. Différents types d'hémocytes chez *M. edulis*. Images tirées de Le Foll *et al.*, (2010).

Les hémocytes sont impliqués lors du processus inflammatoire et ont un rôle dans le processus de réparation des tissus. La réponse immunitaire comprend quatre événements : l'adhérence, l'absorption, la destruction et l'élimination des particules étrangères (Feng, 1988). L'adhérence et la reconnaissance du non-soi sont essentielles pour initier la réponse immunitaire, car c'est l'interaction entre ces protéines et les motifs de reconnaissance de la paroi bactérienne qui déclenche la réaction immunitaire. Cette reconnaissance est possible grâce aux PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*). Il s'agit d'un motif de reconnaissance présent sur la surface des micro-organismes tel que les lipopolysaccharides (LPS, dans lesquels sont contenus les lipides A qui sont à l'origine de la toxicité de plusieurs bactéries Gram-négatives), les acides teichoïques qui sont présents seulement chez les bactéries Gram-positives et le peptidoglycane (Beutler, 2004; Perry *et al.*, 2004; Wedenmaier & Peschel, 2008). Tel que le montre la figure 2, les bactéries Gram-négatives (figure 2 a) et Gram-positives (figure 2 b) ne présentent pas la même paroi cellulaire. La membrane externe des bactéries Gram-positives est caractérisée par plusieurs couches de

peptidoglycane qui représentent de 40 à 80 % de la matière sèche de la paroi et elle contient des acides tels que les acides teichoïques. Les bactéries Gram-négatives comportent également du peptidoglycane, mais en proportion moindre (une seule couche), recouvert d'une membrane composée de molécules lipidiques, de polysaccharides et de protéines. Les complexes lipides-polysaccharides sont appelés lipopolysaccharides ou LPS.

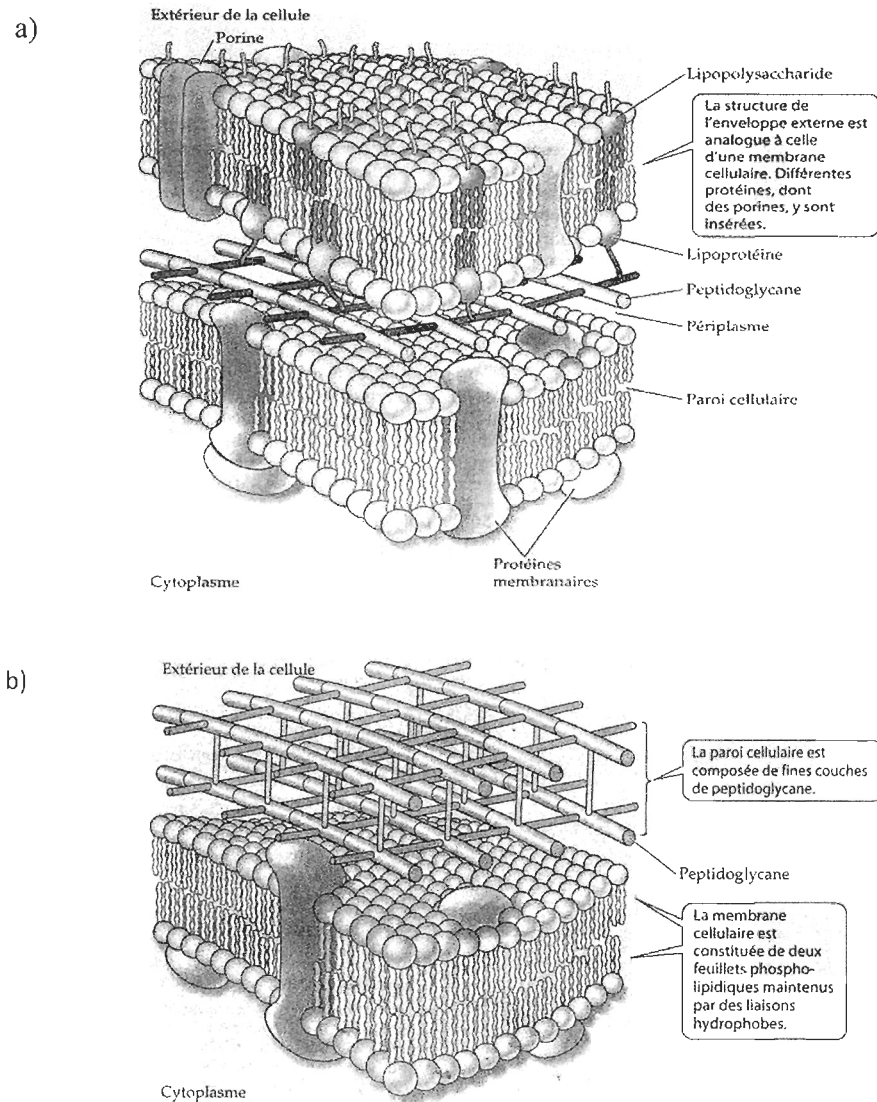


Figure 2. Membrane cellulaire d'une bactérie a) Gram-négative et b) Gram- positive.

Schéma tiré de Perry *et al.* (2004)

Chez l'huitre *Crassostrea gigas*, plusieurs protéines de reconnaissance du non-soi ont été identifiées : les lectines (Gueguen *et al.*, 2003), les protéines de liaison au LPS qui permettent la reconnaissance des bactéries Gram-négatives (Gonzalez *et al.*, 2005), les protéines de reconnaissance du peptidoglycane qui permettent la reconnaissance des bactéries Gram-positives (Itoh & Takahashi, 2008) et les protéines de liaison au β -glucane (Itoh & Takahashi, 2009). Après le processus de reconnaissance, l'absorption, est caractérisée par la phagocytose des débris tissulaires et des bactéries qui auraient pu pénétrer dans les tissus des bivalves. Lors de la phagocytose, durant laquelle il y a formation de pseudopodes qui permettent à la cellule d'envelopper les particules étrangères, entraînant leur internalisation dans une vésicule appelée phagosome. La destruction de ces particules étrangères relève de deux procédés qui agissent simultanément ou séparément dans la cellule: les enzymes lysosomales et la flambée oxydative. La flambée oxydative est catalysée par l'assemblage du complexe enzymatique NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydase et induite par la phagocytose. L'oxygène est réduit en métabolites bactéricides, incluant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les groupements hydroxyl (OH) et les anions superoxydes (O_2^-), ce qui crée un environnement microbicide. Ces composés oxygénés réactifs dégradent et tuent les micro-organismes (Pipe, 1992; Perry *et al.*, 2004; Lichtman & Abbas, 2005). D'autres métabolites pouvant avoir une action biocide sont également produits par l'activation de la NADPH oxydase, comme les NO_x , soit l'oxyde nitrique (NO), les nitrites (NO_2^-) et les nitrates (NO_3^-), qui sont des métabolites stables du NO générés par la flambée oxydative (Gourdon *et al.*, 2001).

L'autre composante du système immunitaire est l'immunité humorale. Les facteurs humoraux sont les enzymes lysosomiales, les lectines et les agglutinines qui permettent une dégradation extracellulaire des particules (Chu, 1988). Après la phagocytose et l'internalisation des particules dans le phagosome, le lysosome se lie au phagosome pour former le phagolysosome où les différentes enzymes lysosomiales vont digérer les particules (Seo *et al.*, 2005). Mais les enzymes lysosomiales sont également larguées dans le plasma durant de la phagocytose, ce qui fait de l'activité de ces enzymes un indicateur de l'activité du système immunitaire contre des agents pathogènes (Oubella *et al.*, 1994). La

présence d'agglutinines et de lectines est également importante pour limiter l'action des bactéries en les agglutinant et en favorisant ainsi leur lyse et leur phagocytose. De plus, elles servent également de récepteur aux hémocytes et de médiateur pour la phagocytose (Chu, 1988). Les lectines font partie des protéines reconnaissantes du non-soi et se lient aux oligosaccharides présents à la surface des micro-organismes. Une défense humorale importante est la mélanisation des pathogènes et des tissus endommagés. Cette mélanisation est effectuée à l'aide de la phenoloxydase, un enzyme contenant du cuivre et présent dans l'hémolymphe sous une forme inactive : la prophenoloxydase. La prophenoloxydase est clivée en phenoloxydase qui catalyse la synthèse d'o-diphénol. La polymérisation non-enzymatique des o-diphénols mène à la production de mélanine. L'activité de la phenoloxydase a été démontrée chez plusieurs espèces de bivalves, dont *Mytilus edulis* (Hellio *et al.*, 2007; Munoz *et al.*, 2006; Söderhäll & Cerenius, 1998).

Il y a aussi d'autres effecteurs de l'immunité humorale comme les peptides antimicrobiens (AMPs). Les AMPs sont sécrétés par les hémocytes dans l'hémolymphe et ont un rôle multifonctionnel dans l'immunité innée. Outre leurs propriétés antimicrobiennes, ils interviennent également dans la stimulation de réponses de l'immunité et peuvent exercer des effets immunomodulateurs (Nicolas, 2009). Les AMPs présentent de larges spectres d'activité antimicrobienne vis-à-vis de bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif, de champignons, de protozoaires et de virus enveloppés. Leur diversité structurale est grande. La majorité sont cationiques et sont à l'origine de trois grandes familles : les peptides linéaires formant des hélices, les peptides riches en cystéine avec un ou plusieurs ponts disulfure et les peptides contenant un pourcentage élevé d'un type d'acide aminé (Andrès & Dimarcq, 2004). Le mode d'action des peptides antimicrobiens est principalement la perméabilisation des membranes. Cette perméabilisation entraîne la libération des produits intracellulaires bactériens dans le milieu extérieur entraînant la mort de la bactérie.

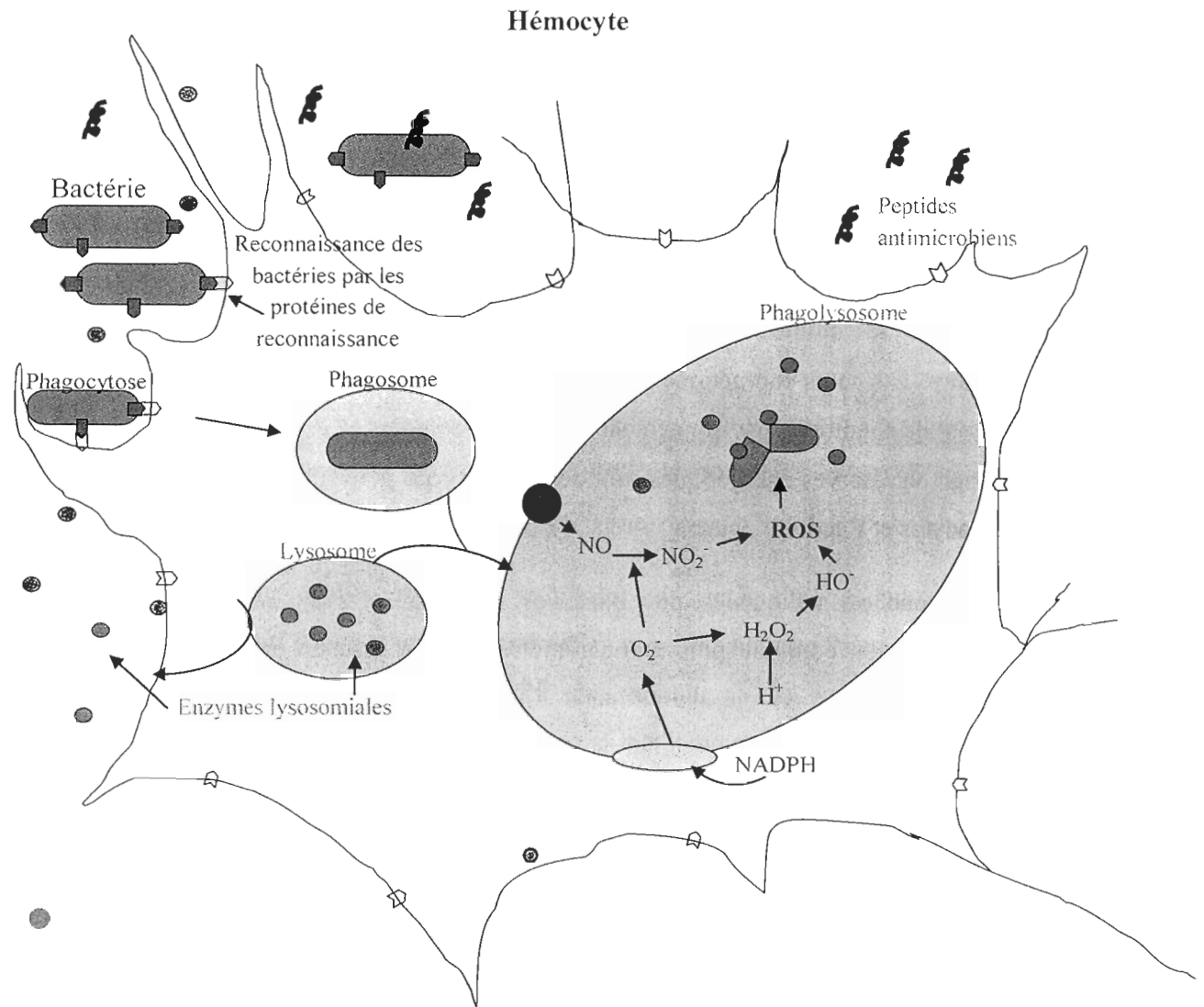


Figure 3. Schéma illustrant l'immunité chez la moule bleue.

Stress et immunité

Le système immunitaire des moules leur permet de répondre aux infections que peuvent causer les bactéries présentes dans leur environnement. Cependant, une exposition à différents stress peut avoir des effets sur l'immunité des bivalves. Les stress tels que le brassage mécanique, la réduction de la salinité et l'exposition à l'air ont comme effets de diminuer la concentration d'hémocytes, l'activité phagocytaire et la flambée oxydative ainsi que d'augmenter l'activité de la phosphatase acide. (Blaise *et al.*, 2002; Bussell *et al.*, 2008; De Donno *et al.*, 2008; Kuchel *et al.*, 2010; Oweson & Hernroth, 2009). L'état physiologique des moules est également un paramètre qui peut influencer leur réponse immunitaire. Les coûts énergétiques qu'engendrent la gamétogénèse et la ponte durant une période où les conditions environnementales sont stressantes (*e.g.* températures élevées) et le stockage de réserves énergétiques sont des facteurs qui peuvent affecter la concentration des hémocytes et l'activité phagocytaire (Delaporte *et al.*, 2006).

Les souches pathogènes des bactéries du genre *Vibrio* interagissent avec les hémocytes en interférant sur plusieurs paramètres de leur système immunitaire, comme le nombre d'hémocytes en circulation dans l'hémolymphe, leur propriété d'adhésion et l'activité phagocytaire, en augmentant la production de ROS et en régulant l'expression de certains gènes reliés à la réponse immunitaire. (Lambert *et al.*, 2003; Labreuche *et al.*, 2006; Parisi *et al.*, 2008). Le genre *Vibrio* est d'ailleurs à l'origine de divers épisodes de mortalité chez les bivalves. Par exemple, en France, depuis 1991, des bactéries du genre *Vibrio*, conjointement à d'autres facteurs environnementaux tels qu'une augmentation de la température de l'eau et une diminution de la salinité, sont responsables d'un taux de mortalité allant jusqu'à 90% en période estivale dans les productions d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* (IFREMER, 2012; Lambert *et al.*, 2007; Munari *et al.*, 2011; Matozzo *et al.*, 2007).

Les moules sont également exposées à des bactéries indigènes non-pathogènes et de façon sporadique à des bactéries exogènes du milieu marin provenant du rejet des eaux usées (Roslev *et al.*, 2009). Bien que différentes études mentionnées aient déjà été réalisées

afin de connaître la réaction du système immunitaire des bivalves face à une exposition à des bactéries, elles ont majoritairement été effectuées *in vitro*, pour étudier la réponse des hémocytes exposés majoritairement avec des bactéries pathogènes ou avec des quantités supérieures de bactéries (pathogènes ou non) que celles qui se retrouvent généralement dans le milieu marin, soit entre 10^6 et 10^9 bactéries mL^{-1} (Araya *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2009; Blaise *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2003). De plus en plus d'études sur l'interaction entre le système immunitaire des bivalves et les bactéries sont effectuées *in vivo*. Certaines études ont démontré qu'une infection avec *Vibrio spp.* chez plusieurs espèces de bivalves pouvait provoquer une surexpression du gène Tg-sHSP, relié aux «*small heat shock proteins*» (Bao *et al.*, 2011), une sous-expression des gènes codant pour certains peptides antimicrobiens (Li *et al.*, 2010 b), une diminution de la capacité phagocytaire et de l'adhérence des hémocytes ainsi qu'une augmentation de la production de ROS (Labreuche *et al.*, 2006). Mais encore fois, ces études ont été réalisées majoritairement avec des bactéries pathogènes ou avec une quantité de bactéries supérieure à celles qui sont rapportées dans les environnements côtiers. Il y a donc un manque de connaissances sur les effets de ces bactéries non-pathogènes exogènes à l'environnement marins sur la réponse immunitaire des bivalves aux concentrations auxquelles elles sont retrouvées dans l'environnement.

Objectifs et hypothèses

Au Québec, la production de moules est passée de 66 tonnes en 1996 à 540 tonnes en 2009, allant même jusqu'à atteindre 753 tonnes en 2005 (Anonyme, 2007). Bien que des mortalités élevées chez les moules causées par des particularités phénotypiques aient été rapportées dans les années 90 (Tremblay *et al.*, 1998; Myrand *et al.*, 2000), aucune mortalité causée par des maladies infectieuses n'a cependant été constatée chez *Mytilus edulis* sauvage ou d'élevage. Une production mytilicole plus intensive et une détérioration de la qualité de l'eau pourraient augmenter le risque de propagation de maladies et mener à des mortalités massives ou imposer d'autres contraintes sur l'expansion des cultures de moules (FAO, 2011). Le contact avec des bactéries non-indigènes pourrait mobiliser le

système immunitaire de la moule bleue et la rendre plus vulnérable aux conditions de stress soumise par son environnement.

L'objectif général de ce projet a été d'évaluer la réactivité de l'immunocompétence cellulaire et humorale de la moule bleue (*Mytilus edulis*) face à une exposition *in vivo* à différentes souches bactériennes susceptibles de se retrouver en zone côtière à proximité des élevages de moules. D'une part, une souche bactérienne indigène au milieu marin, *Vibrio splendidus* a été utilisée. D'une autre part, les souches *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* ont été utilisées puisqu'elles ne sont pas pathogènes mais sont exogènes à l'environnement des moules et se retrouvent en grande quantité dans les eaux marines côtières. Les infections réalisées avec *E. coli* et *E. faecalis* avaient pour but de mieux comprendre l'effet de bactéries Gram-négatives et Gram-positives provenant de rejets d'origine anthropique ou agricole sur le système immunitaire de la moule bleue, alors que celles réalisées avec *Vibrio splendidus* avaient pour but d'évaluer l'effet d'une souche indigène sur l'immunité de la moule avec une quantité classiquement retrouvée dans le milieu marin. Ainsi trois challenges avec 0, 10^2 , 10^3 et 10^4 bactéries (plus un groupe non-injecté appelé contrôle) ont successivement été réalisés avec les souches d'*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Vibrio splendidus* durant les mois de septembre et de décembre afin de considérer l'état physiologique des moules en fonction de leur cycle reproducteur.

Les hypothèses sont que l'immunocompétence est modifiée par une infection bactérienne par rapport à un témoin non infecté (H1), que l'immunocompétence varie selon la souche bactérienne utilisée pour l'infection (H2), que l'immunocompétence varie selon la durée de l'infection (H3) et que l'immunocompétence varie selon la concentration de bactéries injectées lors de l'infection (H4).

CHAPITRE 1

EXPOSURE OF A SENTINEL SPECIES (*MYTILUS EDULIS*) TO FECAL BACTERIA IN COASTAL WATERS: EFFECT ON THE IMMUNE SYSTEM

Abstract

Many bacterial species are natural inhabitants of aquatic environments. However, in estuarine coastal watersheds, the rapid increase of urbanization and the intensification of anthropogenic use of the watershed could lead to the introduction of exogenous bacteria (e.g. fecal bacteria such as *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*) in coastal waters. Filter feeding bivalves living in these coastal areas can accumulate a high number of bacteria, including indigenous and exogenous species. Presently, most investigations dealing with the interaction of bacteria and bivalves focus on the effects of bacterial pathogens alone or their interactive effects with other stressors, like chemical pollutants, on the physiology or the immune capacity of commercial species (e.g. oyster). Since *Mytilus edulis* is widely used as a sentinel species in ecotoxicology, the aim of this study was to assess the effect of its potentials exposure toward *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* on its immune defenses. For this purpose, we have compared the effect of such a bacterial challenge with the effect of an exposure toward *Vibrio splendidus* which is considered as an indigenous *Mytilus edulis* species of coastal estuarine waters. The three bacterial challenges were realized *in vivo*, using bacterial concentrations that are representative of the environment loads (10^3 to 10^5 cells ml^{-1}) and conducted in September and in December to get distinct thermal conditions (16°C and 3°C respectively) that are representative of fall in Québec (Canada), a period characterised by high rainfall events allowing important bacterial runoff. The immune response of *Mytilus edulis* was determined after 24 h and 48 h of post-challenge on the basis of both cellular (total haemocytes count, cell viability, phagocytosis, production of NO_x and ROS) and humoral (hydrolytic enzymes) parameters. Our results demonstrated no inhibitory nor inductive effect of the bacterial challenges on the mussels' immune responses, whatever the bacterial

strain, its concentration and the period of the challenge. In conclusion, the presence of faecal bacteria in coastal waters does not represent an additional threat for immune competency.

1.1 INTRODUCTION

Blue mussel (*Mytilus edulis*) is a major species in shellfish farming in eastern Canada (DFO, 2011) and is well recognised as a sentinel species in ecotoxicology. In coastal areas, mussels can be exposed to various abiotic factors that may act as physiological stressors or immunomodulators, leading exceptionally to large mass mortality events in cultivating areas (FAO, 2011). Temperature (Munari *et al.* 2011), salinity, mechanical stress (Bussell *et al.* 2008, Kuchel *et al.* 2010) and contaminants (Gagnaire *et al.*, 2007; Wootton *et al.*, 2003) are typically abiotic factors that can induce changes in the abundance or in the specific functions of immune cells (Bussell *et al.*, 2008; Hannam *et al.*, 2010; Kuchel *et al.*, 2010; Munari *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2009; Gagnaire *et al.*, 2007; Paul-Pont *et al.*, 2010).

Bivalves are also subjected to constant microbial threats in the natural environment which may represent additional stressors. Their total concentration can reach 10^5 to 10^6 per mL in water of coastal areas (Jacquet *et al.*, 1998; Li & Dickie, 2003; DFO, 2011) and increase by 100 fold in bivalves flesh (Wright *et al.*, 1996) as a result of the filtration activity of the latter. Among these bacteria, some are indigenous species of the marine environment (e.g. *Vibrio spp.*) but some others like fecal bacteria indicators are exogenous species originating from anthropized watersheds or direct sewage discharges. *Vibrio spp.* are widespread indigenous strains and their concentration can reach 10^3 bacteria per mL. They can be pathogenic or not, or opportunistic for bivalves but they are reported as the causing agent in 20% of shellfish bacterial diseases (Garay *et al.*, 1985; Lane & Birkbeck, 2000; Potasman *et al.*, 2002; Pruzzo *et al.*, 2005). *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* are also common species of coastal areas but reported as exogenous and related to fecal contamination. The life span of these exogenous bacteria is relatively short in the marine environment, around 24 hours for *E.coli* (Roslev *et al.*, 2009; Hurst *et al.*, 2002). However, their bioconcentration was reported in the flesh of mussels after only one hour of *in vivo* exposure (Marino *et al.*, 2005). They may also represent a real threat for bivalve health in targeting their immune system. Akaishi *et al.*, (2007) reported that blue mussel

exposed *in vivo* to municipal wastewater lost their ability to resist to pathogens. An *in vivo* challenge of *Plactinopecten vessoensis* to *E. coli* and *E. faecalis* led to a modulation of the activity of several enzymes from the hemolymph and the haemocytes of the scallop (Li *et al.*, 2010 a).

The immune system of bivalves comprises cellular and humoral defences. Immune cells called haemocytes and granulocyte are recognized as the main cellular effectors. During an infection, haemocytes react to the inflammation by a panel of activities such as phagocytosis and production of reactive oxygen species (ROS) or nitrogen oxides (NO_x) to engulf and neutralized infectious agents respectively. In addition to these cellular defences, the humoral defences located in the plasma include several lysosomal enzymes and several proteins like agglutinins, lectins and antimicrobial peptides. The humoral factors have a role of defence and recognition the foreign (non-self) micro-organisms. For example, agglutinins and lectins attach the haemocytes to non-self particles as a cell surface recognition factor (Chu, 1988). This system is typically able to recognize microorganisms by a common structure present on the membranes of the latter. Those structures, known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), are receptors as lipoteichoic acid (LTA) in Gram-positive bacteria and lipopolysaccharide (LPS) in Gram-negative bacteria (Beutler, 2004; Feng, 1988; Perry *et al.*, 2004; Pipe, 1992; Wedenmaier & Peschel, 2008).

During bacterial infections, studies demonstrated an increase of the mortality of bivalves, an increase of the number of haemocytes and a decrease of their adherence (Costa *et al.*, 2009; Labreuche *et al.*, 2006). In addition, some *in vitro* studies with haemocytes have demonstrated that some bacterial infection (*Vibrio spp.*, *Micrococcus lysodeikticus*) can lead to a decrease of the phagocytic activity and an increase of the production of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (NO_x) (Lambert *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2009). However, the major drawback of these studies cited above using *in vivo* challenges is that bacterial concentrations used are very high (around 10⁷ bacteria and more) and do not represent the actual bacterial concentrations to which bivalves are exposed naturally. It is important to learn more about the effects of these bacteria, at

environmentally representative concentrations and at different temperatures representative of seasonal variations of water temperature, on the immune system of the blue mussel to determine if the contact with exogenous bacteria can make mussels more vulnerable to pathogens through an alteration of their the immune system.

High rainfall events that generally occurred at fall in East Canada. In the bay of Gaspé (Quebec), it leads periodically to the closure of mussel cultivation areas because of the contamination of the water (Girard *et al.*, 2008). Then the objective of this project was to document the immune response of *Mytilus edulis* toward *in vivo* infections with two bacterial fecal indicators, *E. coli* and *E. faecalis* were especially selected to assess the effect of a Gram-negative and a Gram-positive bacteria respectively, on the reactivity of the immune system of the mussel in response to the challenge. These two infections were compared to an *in vivo* infection with an indigenous *V. splendidus* strain, known to generate no immune response in *M. edulis* during *in vitro* exposition (Tanguy *et al.*, 2011). The exposure times to bacteria were 24 h and 48 h. Both durations were chosen in accordance to the life span of *E. coli* and *E. faecalis* in the field and in order to gather relevant information about potential “chronic and immunosuppressive effects” of such bacterial challenge in addition to multiple abiotic stressors mussels will also have to face with. In addition, an unchallenged group of mussels was use to assess the effect of the injection since muscle tissues may have been injured by the infection during the challenge and an inflammatory response may have been inducing to repair damaged tissue, remove the broken cells (by phagocytosis) and to control the microorganisms that have may entered by the wound. The injection may enhance an increase of the number of haemocytes in the muscle and induce their phagocytic activity (Coles & Pipes, 1994; Feng, 1988; Perry *et al.*, 2004). That is why we firstly to make sure that immune parameters of non-injected mussels were different than unchallenged mussels (infected with sea water).

The experiments were done in September and in December 2010 to compare the immune response of mussels during two contrasted period of thermal conditions during the fall as well as different physiological status of mussels.

Hence this study allowed us to investigate the potential impact of exogenous bacteria on the immune response of *Mytilus edulis*, by testing these following hypotheses: immunocompetency is changed by a bacterial infection from an uninfected control (H1), immunocompetency varies depending on the bacterial strain used for infection (H2), immunocompetency varies depending on the duration of infection (H3) and immunocompetency varies depending on the concentration of bacteria injected during the infection (H4).

1.1.2 MATERIAL AND METHODS

1.2.1 Mussels

Collection and acclimation of mussels was done in September and in December 2010. Two-year old animals (mean length = 67 ± 4 mm) were collected on a commercial shellfish farm from Magdalen Islands (Québec, Canada). The gonado somatic index was 12 ± 4 % in September and 22 ± 5 % in December. Upon their arrival at the laboratory, mussels were maintained for 10 days in closed circuit filtrated seawater tanks with aeration. Temperature in the tanks was 10°C. Every two days, half the water was changed, dissolved oxygen concentration and temperature were monitored, and mussels were fed with an algal concentrate composed of *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheriei* and *Nannochloropsis* sp. ($30000 \text{ cells. mL}^{-1}$). After 10 days of acclimation, a small notch was carved in the dorsal side of the shell for further *in vivo* bacterial challenges. Then, the mussels were maintained in acclimation for three additional days prior to bacterial challenges.

1.2.2 Bacterial strains

All bacterial strains were grown in Tryptic Soy Broth (TSB) at room temperature for *Vibrio splendidus* (*V.splendidus* 7SHRW, GRAM-) and at 37°C for *Escherichia coli*

(*E.coli*, GRAM-, ATCC 25922) and *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis* 2724, GRAM+) for a 24 h period. The growth curve of each strain was realised by measuring the optical density at 600 nm (OD_{600}) every 2 h in parallel with enumeration of total cells by flow cytometry, according to the protocol proposed by Lebaron et al. (2002). The following equations represent the relation between OD_{600} and their corresponding cell number for each strain:

$$E. coli: \text{Number of bacterial cells} = 6.10^8 \times OD_{600} - 7.10^7 \dots\dots\dots (1)$$

$$E. faecalis: \text{Number of bacterial cells} = 3^{E+08} \times OD_{600} - 6^{E+06} \dots\dots\dots (2)$$

$$V. splendidus: \text{Number of bacterial cells} = 4^{E+07} \times OD_{600} + 2^{E+06} \dots\dots (3)$$

1.2.3 Bacterial Challenges

Three groups of 15 mussels were inoculated within their adductor muscle with 100 μ l of a sterile seawater solution inoculated with 0 (unchallenged), 10^2 , 10^3 or 10^4 living bacterial cells. All solutions were plated on Tryptic Soy Agar (TSA) to test the viability of the cells inoculated. The inoculated mussels were maintained out of the water for 30 minutes after the injection to promote bacteria diffusion in their tissues. To test the effect of injection on immune parameters, an additional group of 15 mussels (non-injected) without any treatment was subjected to the same handling conditions including the 30 minutes of emersion mentioned above. For each assay, the five groups were triplicated in individual aerated tanks filled with 0.2 μ m filtrated seawater and maintained for a total period of 48 hours at 15 °C in September and at 10°C in December. Due to technical constraints, the three challenges realized in September and December could not be performed simultaneously on the same mussel batch, nevertheless all treatments (non-injected, unchallenged and challenged) were applied for each bacterial strain tested.

1.2.4 Collection of hemolymph

Hemolymph was collected within the adductor muscle 24 h and 48 h after injection using a disposable syringe equipped with a 23g needle. For each group, the hemolymph of 5 individuals from the same tank was pooled. Hemolymph was filtered through an 80 μm filter before analysis to avoid clogging of cytometer by aggregates.

1.2.5 Cellular immune parameters analyses by flow cytometry

All cellular immune parameters of the hemocyte population were determined with a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). To discriminate hemocytes from debris during the cellular analyses, hemocytes were labeled with SYBR[®] Green I (final concentration: 10 X, Invitrogen) in the dark for 10 minutes. The labeled hemocytes were discriminated from background on a FL1 (530 nm) versus Forward scatter height (FSC-H, related to cell size) cytogram due to their high fluorescence intensity relative to their high nucleic acid content. This hemocyte population was then gated on a FSC-H versus Side Scatter height (SSC-H, related to cell complexity) cytogram and the settings (FSC Linear E-00; SSC 227 Log) were saved for further analyses on 10000 events.

Viability

Hemocyte viability was determined using the propidium iodide dye (Sigma P4170; final concentration 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) as reported in Duchemin *et al.* (2008).

Abundance of hemocytes

Hemocytes counting protocol was adapted from Duchemin *et al.* (2008). Results are expressed as the abundance of hemocytes per mL of hemolymph.

ROS production

In September, hemocytes were incubated in a 1 μM final concentration DCF-DA dye solution (5 (6) carboxy-2'7'-dichlorofluorescein-diacetate from Sigma #21884) during 10 minutes in the dark at room temperature. After incubation, the cell fluorescence was

quantified on the FL1 detector. In December, hemocytes were incubated in a 10 μ M final concentration dye solution (5 (6) carboxy-2'7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate from Invitrogen #C-400) during 2 hours in the dark at room temperature. The cell fluorescence was also quantified on the FL1 detector. Results were expressed as the mean fluorescence in arbitrary unit (a.u.) detected in cells.

Phagocytic capacity

Phagocytic capacity of hemocytes was determined according to Duchemin *et al.* (2008). Fluoresbrite YG latex beads of 1.716 μ m diameter (Analychem Corp. #17687) were added to 200 μ l of hemolymph with a ratio of 30 beads per hemocyte into a 96-well microplate. The microplate was gently centrifuged 5 min at 300 g and incubated in the dark at room temperature for 4 h. Then, hemocytes were resuspended in 200 μ l of an anticoagulant solution (Auffret *et al.*, 2006) and analyzed on the FL1 detector. The recorded cell fluorescence is proportional to the amount of fluorescent beads that are engulfed and/or stucked on cells. Therefore, to assess the percentage of hemocytes with adhered beads, 3% sodium azide (phagocytic activity inhibitor) was added during the assay for three additional samples. The phagocytic capacity, also called phagocytic index, was determined, on the basis of the FL1-fluorescence, as the percentage of hemocytes having engulfed three beads and more corrected by the percentage of hemocytes with three and more adhesive beads.

Nitrogen oxides (NO_x) production

Hemocytes were incubated in a 10 μ M final concentration DAF-FM dye solution (4-amino-5-methylamino-2', 7' Difluofluorescein diacetate from Invitrogen #D23844) during 10 minutes in the dark at room temperature. Cellular fluorescence was quantified using the FL1 detector. NO_x production was expressed as the mean fluorescence in arbitrary unit (a.u.) detected in cells.

1.2.6 Humoral immune parameters

Hemolymph was centrifuged at 1800 *g* 10 minutes at 4°C. The supernatant (plasma) was collected and stored at - 80°C until further analyses.

Protein determination

The protein concentration of plasma was determined using the method of Bradford (1976). Bovine serum albumin was used as standard and absorbance was measured at 595 nm.

Prophenoloxidase activity-like (proPO)

The method was adapted from Asokan *et al.* (1997). Briefly, sodium dodecyl sulfate (SDS) 1 mg.mL⁻¹ final concentration was added to the plasma in a 96-well microplate as an enzymatic activator. Samples were incubated for 30 min at 37°C under agitation. After incubation, L-DOPA (3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine, 3 mg.mL⁻¹ final concentration) was added as substrate. The absorbance was measured at 492 nm each minute during 15 min with a SpectraMax 190 spectrophotometer (Molecular devices). One activity unit was defined as an increase of the absorbance of 0.001 per minute and the activity of the prophenoloxidase enzyme was normalized as unit.mg protein⁻¹.

Acid phosphatase activity (AP)

The method was modified from Andersch and Szczypinski (1947) and Cheng (1992). The 4-nitrophenylphosphate (pNPP) was used as substrate and incubated (12 mM final concentration) with the plasma for 60 min at 37°C under agitation. The reaction product, *p*-nitrophenol, was measured at 405 nm. The AP activity was expressed as nmol of nitrophenol.mg protein⁻¹.

L-leucine-aminopeptidase activity (LAP)

According to Travers *et al.* (2008), the substrate used for the reaction was the L-leucine-*p*-nitroanilide and was added to plasma (10 mM final concentration in Tris buffer, pH 8). The LAP activity was measured each minute at 405 nm during 30 minutes and

calculated using a standard curve ranging from 0 to 100 mU. mL⁻¹. The concentration of LAP was expressed as mU.mg protein⁻¹.

1.2.7 Statistical analyses

Significant differences between non-injected, unchallenged and injected were tested by four-ways analysis of variance (ANOVA) using JMP 7.0. Tuckey's HSD followed to identify differences between groups. The Scheirer-Rey-Hare test was used in case of the variances was heterogenic or not normal. For all tests, the dependant variables were the immunological parameters (NO_x production, phagocytic capacity, viability, abundance of hémocytes, proteins concentration, LAP activity, AP activity and proPO activity) and the factors were the sampling time, the month, the bacterial strain and the treatment (bacterial concentration). The Significant differences between non-injected, unchallenged and injected of the dependant variable «ROS production» were tested by three-ways analysis of variance (ANOVA) in September and in December and followed by Tuckey's HSD. Results were deemed significant at $P < 0,05$.

1.3 RESULTS

1.3.1 Non-injected group vs unchallenged group

No significant differences have been observed between the non-injected group and the unchallenged group (Table 1). The treatments had no effects on the viability and the abundance of haemocytes. The mean viability is always higher than 87 % for all groups during both trials. The values of the abundance of haemocytes per mL after 24 h ranged from 2.74×10^5 to 4.73×10^5 haemocytes per mL for the non-injected group and from 2.13×10^5 to 2.91×10^5 haemocytes per mL for the unchallenged group in September (Table 4) and from 2.85×10^5 per mL to 8.19×10^5 per mL for the unchallenged group and from 2.73

$\times 10^5$ haemocytes per mL to 3.82×10^5 haemocytes per mL for the non-injected group in December (Table 5). After 48 h, it range from 1.31×10^5 to 3.09×10^5 haemocytes per mL for the non-injected group and from 2.88×10^5 to 5.32×10^5 haemocytes per mL for the unchallenged group in September (Table 6) and from 2.40×10^5 to 4.50×10^5 haemocytes per mL for the non-injected group and from 4.40×10^5 to 5.44×10^5 haemocytes per mL for the unchallenged group in December (Table 7).

No effect of the treatments on all tested cellular parameters has been observed (Table 1 and 2). The Tuckey's HSD showed that the significant differences observed ($P < 0,05$) are between different groups of mussels and cannot be considered as effects of infections (data not shown). The mean values of the phagocytic capacity after 24 h for the non-injected group ranged from 11% to 35 % in September and from 19% to 42% in December while after 48 h, they ranged from 23% to 39% in September and from 56% to 57% in December. For the unchallenged group, values ranged from 20% to 40 % in September (Table 4) and from 36% to 44% in December after 24 h (Table 5) and from 33% to 44% in September (Table 6) and from 61% to 77% in December after 48 h (Table 7). Results for ROS and NO_x production are presented in Table 4 to 7. In September, the mean ROS production (values in arbitrary units) after 24 h for the non-injected group ranged from 770 a.u. to 1316 a.u. and the values for the unchallenged group ranged from 847 a.u. to 1334 a.u. After 48 h, they ranged from 1031 a.u. to 1303 a.u. for the non-injected group and from 1012 a.u. to 1572 a.u. for the unchallenged group. In December, the mean values of the ROS production were 587 a.u. and 540 a.u. after 24 h and 430 a.u. and 791 a.u. after 48 h for the non-injected group and were 483 a.u. and 612 a.u. after 24 h and 325 a.u. and 566 a.u. after 48 h for the unchallenged group. For the NO_x production after 24 h in September, the values of the non-injected group range from 133 a.u. to 146 a.u. and from 130 a.u. to 163 a.u. for the unchallenged group and in December, the values ranged from 120 a.u. to 162 a.u. for the non-injected group and from 113 a.u. to 138 a.u. for the unchallenged group. After 48 h, the NO_x production values in September range from 130 a.u. to 155 a.u. for the non-injected group and from 110 a.u. to 145 a.u. for the unchallenged group and in December, it range from 114 a.u. to 127 a.u. for the non-injected group and from 111 a.u.

to 130 a.u. for the unchallenged group. Whatever the sampling time or the month, no significant differences had been observed between the non-injected and the unchallenged groups and this, for all tested humoral parameters (Table 3). As for cellular parameters, the Tuckey's HSD showed that the significant differences observed ($P < 0,05$) are between different groups of mussels and cannot be considered as effects of infections (data not shown). Results for the humoral parameters after 24 h are presented in Tables 8 and 9 after 48 h in Tables 10 and 11. After 24 h, a strong variability had been observed in September and in December for the acid phosphatase activity (AP) ranging from 8 to 128 nmol.mg⁻¹ proteins for the non-injected group and from 10 to 90 nmol.mg⁻¹ proteins for the unchallenged group. After 48 h, AP of the non-injected group range from 46 to 67 nmol.mg⁻¹ proteins in September and from 8 to 78 nmol.mg⁻¹ proteins in December. For the unchallenged group AP ranges from 39 to 88 nmol.mg⁻¹ proteins in September and from 21 to 69 nmol.mg⁻¹ protein in December. The prophenoloxydase-like activity after 24 h ranged from 5 to 16 U.mg⁻¹ proteins for the unchallenged group and from 4 to 17 U.mg⁻¹ proteins for the challenged group. After 48 h, ProPO-like ranged from 3 to 17 U.mg⁻¹ for the non-injected group and from 4 to 18 U.mg⁻¹ for the unchallenged group. The L-leucine-aminopeptidase activity, ranged from 25 to 131 mU.mg⁻¹ proteins for the unchallenged group and from 14 to 139 mU.mg⁻¹ proteins for the non-injected group after 24 h. After 48 h, LAP ranged from 14 to 59 mU.mg⁻¹ proteins for the non-injected group and from 13 to 51 mU.mg⁻¹ proteins for the unchallenged group.

1.3.2 Challenged vs unchallenged groups

Viability and abundance of haemocytes

No significant differences were observed between the challenged and the unchallenged groups (Table 1). The results showed that the treatment had no effects on the viability of the haemocytes. The percentage of viable haemocytes was never less than 85 % 24 h after the challenge for both trials as reported in Tables 4 and 5 and 48 h after the

challenge as reported in Table 6 and 7, respectively for September and December. However, after 24 h the abundance of haemocytes presented a high variability between replicates in each group, ranging from 2.13×10^5 to 8.19×10^5 cells.mL⁻¹. None dose response was demonstrated, neither in September nor in December, 24 h and 48 h after the challenge. 48 h after the challenge, the values range from 1.95×10^5 to 3.90×10^5 cells.mL⁻¹ in September and from 2.25×10^5 to 5.89×10^5 cells.ml⁻¹ in December between the unchallenged and the infected groups, regardless of the dose and the period of the trial.

Table 1: Four ways ANOVAs of the effect of time (24 h and 48 h), treatment (non-injected, unchallenged, 10^2 , 10^3 and 10^4 cfu injected), month (September and December) and the strain (*V. splendidus*, *E. coli* and *E. faecalis*) and their interaction on cellular immune parameters

	Phagocytic capacity				NO _x production			
	df	SS	F	P	df	SS	F	P
month	1	2151,9	15,6	0,0001*	1	5028,6	10,2	0,0018*
strain	2	5377,8	19,5	<,0001*	2	5328,9	5,4	0,0057*
time	1	2773,4	20,2	<,0001*	1	1032,7	2,1	0,1505
treatment	4	2433,8	4,4	0,0023*	4	991,3	0,5	0,734
month*strain	2	4259,4	15,5	<,0001*	2	1568,4	1,6	0,2082
month*time	1	1883,1	13,7	0,0003*	1	0,3	0,0006	0,9806
strain*time	2	3153,6	11,5	<,0001*	2	6358,2	6,4	0,0022*
month*strain*time	2	2457,1	8,9	0,0002*	2	5198,3	5,3	0,0064*
month* treatment	4	179,2	0,3	0,8602	4	2325,7	1,2	0,3237
strain* treatment	8	1661,1	1,5	0,1606	8	3053,8	0,8	0,6265
month*strain* treatment	8	482,1	0,4	0,8959	8	2375,6	0,6	0,7747
time* treatment	4	104,4	0,2	0,9433	4	3373,2	1,7	0,1523
month*time* treatment	4	110,6	0,2	0,9373	4	3055,9	1,5	0,1925
strain*time* treatment	8	836,8	0,7	0,6379	8	5096,8	1,3	0,2543
month*strain*time*	8	592,8	0,5	0,8252	8	5301,9	1,3	0,2287
treatment								
Residual	120	16499,8			120	59195,1		

	Viability				Abundance			
	df	SS	F	P	df	SS	F	P
Month	1	0,5	1,1	0,2888	1	0,5	1,1	0,2888
Strain	2	6,6	7,8	0,0006*	2	6,6	7,8	0,0006*
Time	1	0,001	0,002	0,9661	1	0,001	0,002	0,9661
treatment	4	4,3	2,5	0,0428*	4	4,3	2,5	0,0428*
month*strain	2	4,4	5,2	0,0064*	2	4,4	5,3	0,0064*
month*time	1	0,4	1,01	0,317	1	0,4	1,01	0,317
strain*time	2	2,5	3	0,0547	2	2,5	3	0,0547
month*strain*time	2	0,4	0,5	0,5853	2	0,4	0,5	0,5853
month* treatment	4	2,7	1,6	0,1708	4	2,7	1,6	0,1708
strain* treatment	8	2,1	0,6	0,7562	8	2,1	0,6	0,7562
month*strain* treatment	8	6,6	1,9	0,0561	8	6,6	2	0,0561
time* treatment	4	2,9	1,7	0,153	4	2,9	1,7	0,153
month*time* treatment	4	0,2	0,1	0,9828	4	0,2	0,1	0,9828
strain*time* treatment	8	2,5	0,7	0,6547	8	2,5	0,7	0,6547
month*strain*time*	8	3,5	1,04	0,4061	8	3,5	1,04	0,4061
treatment								
Residual	120	50,5			120	50,5		

Table 2: Three ways ANOVAs of the effect of time (24 h and 48 h), treatment (non-injected, unchallenged, 10^2 , 10^3 and 10^4 cfu injected) and the strain (*V. splendidus*, *E. coli* and *E. faecalis*) and their interaction on the ROS production in September and December

	ROS production in September				ROS production in December			
	df	SS	F	P	df	SS	F	P
Strain	2	519834,7	5,6	0,0059*	1	165790	4,6	0,0373*
Time	1	249375,2	5,4	0,0240*	1	184956	5,2	0,0284*
strain * time	2	174364,3	1,9	0,1622	1	32362,6	0,9	0,3470
treatment	4	416435	2,2	0,0754	4	468594,8	3,3	0,0205*
strain * treatment	8	1193489,7	3,2	0,0042*	4	68127,4	0,5	0,7527
time * treatment	4	14916,8	0,1	0,9881	4	279269,2	1,9	0,1204
strain * time * treatment	8	87898,1	0,2	0,9824	4	123581,8	0,9	0,4936
Residual	60	2789628,9			40	1429720		

Table 3: Scheirer-Ray-Hare test and Four ways ANOVAs of the effect time (24 h and 48 h), treatment (non-injected, unchallenged, 10^2 , 10^3 and 10^4 cfu injected), month (September and December) and the strain (*V. splendidus*, *E. coli* and *E. faecalis*) and their interaction on humoral immune parameters

	Proteins				L-leucine-aminopeptidase		
	df	SS	F	P	SS	F	P
month	1	45,9	159,7	<,0001*	10,8	22,423	<,0001*
strain	2	4,1	7,1	0,0012*	7,1	7,3758	0,0010*
month*strain	2	0,5	0,9	0,3914	1,9	1,965	0,1446
time	1	0,8	2,7	0,1042	4,2	8,8479	0,0035*
month*time	1	0,9	3,4	0,0691	1,9	3,9197	0,05
strain*time	2	6,3	10,9	<,0001*	8,5	8,8495	0,0003*
month*strain*time	2	1,2	2,1	0,1294	4,3	4,5052	0,0130*
treatment	4	1,8	1,6	0,1856	0,9	0,4641	0,762
month* treatment	4	1,6	1,4	0,2442	1,7	0,9003	0,4662
strain* treatment	8	0,8	0,3	0,94	3,8	0,9772	0,4572
month*strain* treatment	8	1,9	0,9	0,5496	1,4	0,3654	0,9369
time* treatment	4	2,4	2,1	0,0854	2,7	1,3934	0,2403
month*time* treatment	4	0,6	0,5	0,7238	1,9	0,994	0,4136
strain*time* treatment	8	0,8	0,3	0,9519	4,9	1,2765	0,2621
month*strain*time* treatment	8	3,03	1,3	0,2424	6,5	1,697	0,1059
Residual	120	34,5			57,8		

	Acid phosphatase				ProPhenoloxydase
	df	SS	F	P	Scheirer-Ray-Hare
month	1	0,1	6,01	0,0158*	Non-Significatif
strain	2	0,5	24,5	<,0001*	Non-Significatif
month*strain	2	0,3	14,7	<,0001*	Non-Significatif
time	1	0,3	29,8	<,0001*	Non-Significatif
month*time	1	0,2	20,8	<,0001*	Non-Significatif
strain*time	2	0,6	30,4	<,0001*	Non-Significatif
month*strain*time	2	0,3	14,8	<,0001*	Non-Significatif
treatment	4	0,2	6,4	0,0001*	Non-Significatif
month* treatment	4	0,01	0,2	0,9097	Non-Significatif
strain* treatment	8	0,3	3,4	0,0014*	Non-Significatif
month*strain* treatment	8	0,2	2,5	0,0158*	Non-Significatif
time* treatment	4	0,1	1,5	0,2007	Non-Significatif
month*time* treatment	4	0,1	2,7	0,0319*	Non-Significatif
strain*time* treatment	8	0,1	1,1	0,3915	Non-Significatif
month*strain*time* treatment	8	0,2	2,5	0,0152*	Non-Significatif
Residual	120	1,1			

Table 4: Parameters of cellular immunity: viability of haemocytes, abundance of haemocytes, phagocytic capacity, ROS production and NO_x production 24 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in September with *Vibrio splendidus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. Values are mean \pm SD (N=3).

	Non-injected	Unchallenged	10 ²	10 ³	10 ⁴
<i>Vibrio splendidus</i>					
Viability (%)	93 \pm 1	93 \pm 1	92 \pm 1	93 \pm 3	93 \pm 1
Abundance (10 ⁵ haemocytes per mL)	3,16 \pm 1,01	2,67 \pm 1,21	2,88 \pm 1,03	2,81 \pm 1,02	2,77 \pm 0,7
Phagocytic capacity (%)	30 \pm 9	28 \pm 5	27 \pm 21	28 \pm 9	39 \pm 7
ROS production (relative fluorescence)	912 \pm 135	847 \pm 205	863 \pm 246	938 \pm 165	1166 \pm 302
NO _x production (relative fluorescence)	146 \pm 7	163 \pm 15	163 \pm 10	135 \pm 34	136 \pm 16
<i>Enterococcus faecalis</i>					
Viability (%)	96 \pm 1	93 \pm 2	94 \pm 1	96 \pm 1	93 \pm 1
Abundance (10 ⁵ haemocytes per mL)	4,73 \pm 2,14	2,13 \pm 0,5	3,32 \pm 2,45	3,34 \pm 0,9	3,13 \pm 0,06
Phagocytic capacity (%)	11 \pm 14	20 \pm 12	24 \pm 11	17 \pm 3	20 \pm 13
ROS production (relative fluorescence)	770 \pm 179	1334 \pm 319	1266 \pm 186	1021 \pm 168	1129 \pm 150
NO _x production (relative fluorescence)	135 \pm 39	159 \pm 29	150 \pm 35	113 \pm 3	130 \pm 27
<i>Escherichia coli</i>					
Viability (%)	95 \pm 0,8	97 \pm 0,7	95 \pm 0,9	96 \pm 0,5	95 \pm 1,7
Abundance (10 ⁵ haemocytes per mL)	2,74 \pm 0,4	2,91 \pm 0,9	2,42 \pm 0,6	3,40 \pm 0,2	3,08 \pm 0,9
Phagocytic capacity (%)	35 \pm 7	40 \pm 5	27 \pm 16	32 \pm 12	36 \pm 6
ROS production (relative fluorescence)	1316 \pm 232	1151 \pm 136	1069 \pm 130	989 \pm 90	1176 \pm 214
NO _x production (relative fluorescence)	133 \pm 14	130 \pm 12	136 \pm 5	120 \pm 33	118 \pm 17

Table 5. Parameters of cellular immunity: viability of haemocytes, abundance of haemocytes, phagocytic capacity, ROS production and NO_x production 24 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in December with *Vibrio splendidus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. Values are mean ± SD (N=3).

	Non-injected	Unchallenged	10 ²	10 ³	10 ⁴
<i>Vibrio splendidus</i>					
Viability (%)	90 ± 3	87 ± 11	90 ± 7	91 ± 1	87 ± 5
Abundance (10 ⁵ haemocytes per mL)	3,82 ± 1	8,19 ± 5	6,28 ± 2	4,31 ± 2	4,96 ± 2
Phagocytic capacity (%)	19 ± 12	36 ± 8	34 ± 15	33 ± 6	38 ± 5
ROS production (relative fluorescence)	587 ± 27	483 ± 204	689 ± 366	681 ± 163	778 ± 274
NO _x production (relative fluorescence)	126 ± 30	125 ± 15	133 ± 21	155 ± 32	144 ± 15
<i>Enterococcus faecalis</i>					
Viability (%)	93 ± 1	95 ± 2	93 ± 0,9	95 ± 1	94 ± 3
Abundance (10 ⁵ haemocytes per mL)	2,73 ± 2	2,85 ± 0,6	4,38 ± 0,9	2,71 ± 0,8	4,57 ± 0,4
Phagocytic capacity (%)	22 ± 15	38 ± 8	35 ± 9	32 ± 9	41 ± 6
ROS production (relative fluorescence)	-	-	-	-	-
NO _x production (relative fluorescence)	162 ± 37	138 ± 31	143 ± 0,8	128 ± 18	127 ± 10
<i>Escherichia coli</i>					
Viability (%)	88 ± 2	91 ± 5	87 ± 3	90 ± 5	91 ± 4
Abundance (10 ⁵ haemocytes per mL)	2,74 ± 1	3,06 ± 2	2,97 ± 0,8	2,48 ± 0,5	2,79 ± 0,4
Phagocytic capacity (%)	42 ± 8	44 ± 11	38 ± 3	45 ± 8	37 ± 5
ROS production (relative fluorescence)	540 ± 231	612 ± 31	801 ± 176	833 ± 156	727 ± 280
NO _x production (relative fluorescence)	120 ± 16	113 ± 3	98 ± 17	116 ± 9	80 ± 18

Table 6. Parameters of cellular immunity: viability of haemocytes, abundance of haemocytes, phagocytic capacity, ROS production and NO_x production 48 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in September with *Vibrio splendidus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. Values are mean ± SD (N=3).

	Non-injected	Unchallenged	10 ²	10 ³	10 ⁴
<i>Vibrio splendidus</i>					
Viability (%)	92 ± 0,6	94 ± 1	92 ± 2	91 ± 2	88 ± 1
Abundance (10 ⁵ haemocytes per mL)	3,09 ± 0,5	5,32 ± 3,4	1,95 ± 1,8	3,48 ± 7,9	3,90 ± 1
Phagocytic capacity (%)	23 ± 11	33 ± 11	34 ± 9	35 ± 14	41 ± 10
ROS production (relative fluorescence)	1031 ± 276	1012 ± 131	1146 ± 99	1015 ± 302	1227 ± 73
NOx production (relative fluorescence)	155 ± 33	110 ± 17	130 ± 21	140 ± 21	159 ± 15
<i>Enterococcus faecalis</i>					
Viability (%)	92 ± 0,3	89 ± 4	92 ± 4	89 ± 3	92 ± 3
Abundance (10 ⁵ haemocytes per mL)	1,31 ± 1,1	3,03 ± 0,5	3,06 ± 0,6	3,54 ± 0,2	3,41 ± 4,9
Phagocytic capacity (%)	26 ± 24	41 ± 20	50 ± 4	39 ± 16	35 ± 10
ROS production (relative fluorescence)	1074 ± 250	1572 ± 505	1318 ± 58	1166 ± 371	1345 ± 196
NOx production (relative fluorescence)	132 ± 11	145 ± 11	141 ± 12	141 ± 29	121 ± 14
<i>Escherichia coli</i>					
Viability (%)	95 ± 1	96 ± 1	95 ± 1	95 ± 0,4	94 ± 2
Abundance (10 ⁵ per mL)	3,08 ± 0,9	2,88 ± 1,2	2,73 ± 0,1	2,59 ± 0,6	3,16 ± 0,+5
Phagocytic capacity (%)	39 ± 6	44 ± 4	30 ± 15	36 ± 11	40 ± 6
ROS production (relative fluorescence)	1303 ± 221	1141 ± 135	1044 ± 124	970 ± 84	1166 ± 103
NOx production (relative fluorescence)	130 ± 15	127 ± 12	132 ± 4	117 ± 33	114 ± 17

Table 7. Parameters of cellular immunity: viability of haemocytes, abundance of haemocytes, phagocytic capacity, ROS production and NO_x production 48 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in December with *Vibrio splendidus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. Values are mean ± SD (N=3).

	Non-injected	Unchallenged	10 ²	10 ³	10 ⁴
<i>Vibrio splendidus</i>					
Viability (%)	94 ± 0,9	94 ± 1,2	94 ± 1,1	91 ± 4,1	85 ± 6,7
Abundance (10 ⁵ haemocytes per mL)	4,50 ± 3,13	5,06 ± 0,7	3,68 ± 0,4	5,47 ± 1,26	4,47 ± 3,4
Phagocytic capacity (%)	56 ± 15	76 ± 3	63 ± 13	75 ± 18	70 ± 21
ROS production (relative fluorescence)	430 ± 93	325 ± 62	370 ± 23	551 ± 117	756 ± 129
NO _x production (relative fluorescence)	114 ± 18	115 ± 5	105 ± 23	116 ± 12	118 ± 13
<i>Enterococcus faecalis</i>					
Viability (%)	90 ± 4	93 ± 4	93 ± 2	87 ± 10	92 ± 3
Abundance (10 ⁵ haemocytes per mL)	3,64 ± 1,03	4,40 ± 0,5	5,89 ± 5,8	2,48 ± 0,6	4,16 ± 2,4
Phagocytic capacity (%)	56,9 ± 9	61,4 ± 16	69,9 ± 8	60,6 7	59,4 ± 5
ROS production (relative fluorescence)	-	-	-	-	-
NO _x production (relative fluorescence)	116 ± 27	111 ± 24	129 ± 30	131 ± 11	121 ± 10
<i>Escherichia coli</i>					
Viability (%)	91 ± 3	93 ± 2	95 ± 4	92 ± 3	88 ± 3
Abundance (10 ⁵ haemocytes per mL)	2,40 ± 1,3	5,44 ± 0,6	4,9 ± 3,8	2,25 ± 0,7	4,1 ± 0,8
Phagocytic capacity (%)	57 ± 14	73 ± 11	61 ± 22	60 ± 20	80 ± 2
ROS production (relative fluorescence)	791 ± 284	566 ± 176	486 ± 127	556 ± 87	790 ± 260
NO _x production (relative fluorescence)	127 ± 12	130 ± 29	127 ± 17	118 ± 8	160 ± 65

Table 8. Parameters of humoral immunity: L-leucine-aminopeptidase, proPhenoloxydase-like, acid phosphatase and total proteins 24 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in September with *Vibrio splendidus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. Values are means \pm SD (N=3).

	Non-injected	Unchallenged	10 ²	10 ³	10 ⁴
<i>Vibrio splendidus</i>					
L-leucine-aminopeptidase (mU mg protein ⁻¹)	62 \pm 30	97 \pm 30	156 \pm 165	49 \pm 21	82 \pm 9
ProPhenoloxydase-like (U mg protein ⁻¹)	5 \pm 5	7 \pm 1	9 \pm 1	12 \pm 1	11 \pm 5
Acid Phosphatase (nmol mg protein ⁻¹)	88 \pm 94	58 \pm 23	133 \pm 17	88 \pm 30	80 \pm 40
Proteins (mg ml ⁻¹)	1 \pm 0,48	0,5 \pm 0,17	0,6 \pm 0,07	0,7 \pm 0,29	0,5 \pm 0,18
<i>Enterococcus faecalis</i>					
L-leucine-aminopeptidase (mU mg protein ⁻¹)	139 \pm 29	37 \pm 9	72 \pm 48	90 \pm 48	54 \pm 10
ProPhenoloxydase-like (U mg protein ⁻¹)	10 \pm 2	6	7 \pm 1	6 \pm 2	4
Acid Phosphatase (nmol mg protein ⁻¹)	128 \pm 37	77 \pm 32	108 \pm 46	76 \pm 18	69 \pm 23
Proteins (mg ml ⁻¹)	1 \pm 0,5	0,5 \pm 0,1	0,7 \pm 0,3	1 \pm 0,3	1 \pm 0,2
<i>Escherichia coli</i>					
L-leucine-aminopeptidase (mU mg protein ⁻¹)	30 \pm 13	27 \pm 10	26 \pm 12	44 \pm 21	32 \pm 14
ProPhenoloxydase-like (U mg protein ⁻¹)	5 \pm 0,3	6 \pm 1	7 \pm 2	5 \pm 1	8 \pm 3
Acid Phosphatase (nmol mg protein ⁻¹)	109 \pm 56	62 \pm 26	87 \pm 36	72 \pm 30	65 \pm 17
Proteins (mg ml ⁻¹)	0,7 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	0,9 \pm 0,5	0,9 \pm 0,1	1 \pm 0,5

Table 9. Parameters of humoral immunity: L-leucine-aminopeptidase, proPhenoloxydase-like, acid phosphatase and total proteins 24 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in December with *Vibrio splendidus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. Values are means \pm SD (N=3).

	Non-injected	Unchallenged	10 ²	10 ³	10 ⁴
<i>Vibrio splendidus</i>					
L-leucine-aminopeptidase (mU mg protein ⁻¹)	64 \pm 43	131 \pm 111	33 \pm 10	51 \pm 40	52 \pm 6
ProPhenoloxydase-like (U mg protein ⁻¹)	14 \pm 5	16 \pm 6	16 \pm 2	17 \pm 1	15 \pm 0,6
Acid Phosphatase (nmol mg protein ⁻¹)	67 \pm 28	90 \pm 16	89 \pm 19	64 \pm 37	47 \pm 27
Proteins (mg ml ⁻¹)	2 \pm 0,1	1 \pm 0,2	1 \pm 0,6	1 \pm 0,2	2 \pm 0,1
<i>Enterococcus faecalis</i>					
L-leucine-aminopeptidase (mU mg protein ⁻¹)	21 \pm 22	34 \pm 33	18 \pm 12	18 \pm 8	18 \pm 12
ProPhenoloxydase-like (U mg protein ⁻¹)	8 \pm 6	6 \pm 4	6 \pm 3	5 \pm 5	7 \pm 4
Acid Phosphatase (nmol mg protein ⁻¹)	8 \pm 6	10 \pm 4	3 \pm 2	14 \pm 7	13 \pm 7
Proteins (mg ml ⁻¹)	4 \pm 3	3 \pm 1	4 \pm 2	3 \pm 0,4	3 \pm 2
<i>Escherichia coli</i>					
L-leucine-aminopeptidase (mU mg protein ⁻¹)	14 \pm 14	25 \pm 13	48 \pm 26	24 \pm 25	49 \pm 45
ProPhenoloxydase-like (U mg protein ⁻¹)	4 \pm 1	5 \pm 1	5 \pm 1	5 \pm 0,9	6 \pm 1
Acid Phosphatase (nmol mg protein ⁻¹)	24 \pm 36	12 \pm 8	61 \pm 39	13 \pm 14	35 \pm 21
Proteins (mg ml ⁻¹)	4 \pm 3	2 \pm 2	4 \pm 4	3 \pm 3	1 \pm 0,4

Table 10. Parameters of humoral immunity: L-leucine-aminopeptidase, proPhenoloxydase-like, acid phosphatase and total proteins 48 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in September with *Vibrio splendidus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. Values are means \pm SD (N=3).

	Non-injected	Unchallenged	10 ²	10 ³	10 ⁴
<i>Vibrio splendidus</i>					
L-leucine-aminopeptidase (mU mg protein ⁻¹)	59 \pm 25	51 \pm 29	31 \pm 7	95 \pm 115	18 \pm 6
ProPhenoloxydase-like (U mg protein ⁻¹)	3 \pm 1	4 \pm 1	2	2	4 \pm 0,4
Acid Phosphatase (nmol mg protein ⁻¹)	62 \pm 14	61 \pm 32	62 \pm 16	108 \pm 104	34 \pm 9
Proteins (mg ml ⁻¹)	1 \pm 0,2	1 \pm 0,3	1 \pm 0,5	1 \pm 0,2	2 \pm 0,8
<i>Enterococcus faecalis</i>					
L-leucine-aminopeptidase (mU mg protein ⁻¹)	14 \pm 6	32 \pm 25	36 \pm 24	39 \pm 23	20 \pm 19
ProPhenoloxydase-like (U mg protein ⁻¹)	8 \pm 6	8 \pm 4	7 \pm 4	9 \pm 3	8 \pm 7
Acid Phosphatase (nmol mg protein ⁻¹)	46 \pm 40	88 \pm 66	88 \pm 113	77 \pm 38	60 \pm 49
Proteins (mg ml ⁻¹)	2 \pm 2	1 \pm 0,5	1 \pm 1	1 \pm 0,4	2 \pm 1
<i>Escherichia coli</i>					
L-leucine-aminopeptidase (mU mg protein ⁻¹)	41 \pm 34	25 \pm 2	58	31 \pm 2	53 \pm 39
ProPhenoloxydase-like (U mg protein ⁻¹)	10 \pm 3	7 \pm 5	6 \pm 2	4 \pm 0,6	6 \pm 3
Acid Phosphatase (nmol mg protein ⁻¹)	67 \pm 11	39 \pm 21	108 \pm 42	56 \pm 28	62 \pm 24
Proteins (mg ml ⁻¹)	1 \pm 0,2	1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,3	1 \pm 0,2	1 \pm 0,3

Table 11. Parameters of humoral immunity: L-leucine-aminopeptidase, proPhenoloxydase-like, acid phosphatase and total proteins 48 hours after the bacterial challenge (cfu injected) performed in December with *Vibrio splendidus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. Values are means \pm SD (N=3).

	Non-injected	Unchallengedd	10 ²	10 ³	10 ⁴
<i>Vibrio splendidus</i>					
L-leucine-aminopeptidase (mU mg protein ⁻¹)	29 \pm 18	13 \pm 7	24 \pm 17	44 \pm 37	31 \pm 13
ProPhenoloxydase-like (U mg protein ⁻¹)	4 \pm 1	4 \pm 0,7	5 \pm 4	7 \pm 2	7 \pm 2
Acid Phosphatase (nmol mg protein ⁻¹)	40 \pm 27	30 \pm 32	41 \pm 40	17 \pm 9	39 \pm 28
Proteins (mg ml ⁻¹)	4 \pm 2	4 \pm 2	3 \pm 3	3 \pm 2	2 \pm 0,2
<i>Enterococcus faecalis</i>					
L-leucine-aminopeptidase (mU mg protein ⁻¹)	14 \pm 6	21 \pm 2	34 \pm 21	37 \pm 27	18 \pm 11
ProPhenoloxydase-like (U mg protein ⁻¹)	7 \pm 5	4 \pm 1	12 \pm 1	7 \pm 4	5 \pm 2
Acid Phosphatase (nmol mg protein ⁻¹)	8 \pm 7	21 \pm 16	16 \pm 7	19 \pm 4	8 \pm 0,4
Proteins (mg ml ⁻¹)	3 \pm 2	4 \pm 4	2 \pm 0,05	3 \pm 2	4 \pm 2
<i>Escherichia coli</i>					
L-leucine-aminopeptidase (mU mg protein ⁻¹)	28 \pm 6	30 \pm 16	28 \pm 16	46 \pm 19	33 \pm 12
ProPhenoloxydase-like (U mg protein ⁻¹)	17 \pm 2	18 \pm 2	18 \pm 1	16 \pm 3	17 \pm 4
Acid Phosphatase (nmol mg protein ⁻¹)	78 \pm 12	69 \pm 36	52 \pm 3	50 \pm 18	30 \pm 25
Proteins (mg ml ⁻¹)	1 \pm 0,2	1 \pm 0,3	2 \pm 0,4	1 \pm 0,1	1 \pm 0,3

Phagocytic capacity

The phagocytic index 24 h after the infection with *V. splendidus*, *E. faecalis* and *E. coli* was not significantly different for all doses during both trials as reported in Table 1. In September, it ranged from 27% to 39% with *V. splendidus*, from 11% to 24% for *E. faecalis* and from 27% to 40 % for *E. coli* (Table 4). In December, the phagocytic capacity varied from 19% to 38% for *V. splendidus*, from 22% to 41% for *E. faecalis* and from 37% to 45 % for the *E. coli* (Table 5). No significant differences were observed between the unchallenged group and the different infected groups concerning the phagocytic capacity 48 h after the infection (Table 1). The phagocytic index values for the three infections range from 30 to 50% in September (Table 6) and from 60 to 79% in December (Table 7).

ROS production

Whatever the strain, the infections have no effect on the ROS production in September as well as in December (Table 2). After 24 h, the mean values of the ROS production ranged from 770 a.u to 1334 a.u. in September (Table 4) and from 483 a.u to 833 a.u in December (Table 5) and after 48 h, the values range from 970 a.u to 1345 a.u in September (Table 6) and from 370 a.u to 790 a.u in December (Table 7).

NO_x production

No significant difference between the unchallenged group and the infected group has been observed in terms of NO_x production (Table 1). Mean values of NO_x production 24 h after the challenge ranged from 113 a.u to 163 a.u in September (Table 4) and from 80 a.u to 162 a.u in December (Table 5) and from 114 a.u to 159 a.u in September (Table 6) and from 105 a.u to 160 a.u in December 48 h after the challenge (Table 7).

Total proteins

Results showed that treatments had no effect on the total proteins concentration. No significant differences were observed between the challenged and the unchallenged groups whatever the sampling time, the month, the bacterial strain or the treatment (Table 3). In September, the total proteins concentration of the unchallenged groups after 24 h range from 0.5 to 0.8 mg.mL⁻¹ and from 0.5 to 1 mg.mL⁻¹ for the infected groups (see Table 8) and the values are 1 mg.mL⁻¹ for the unchallenged group and range from 0,3 to 2 mg.mL⁻¹ for the infected group 48 h after the infection (Table 10). In December, the values ranged from 1 to 3 mg.mL⁻¹ for the unchallenged group and from 1 to 4 mg.mL⁻¹ for all the infected groups 24 h after the challenge (see Table 9). 48 h after the challenge, the values range from 1 to 4 mg.mL⁻¹ for the unchallenged group and for all infected groups (Table 11).

L-leucine-Aminopeptidase activity

The results obtained 24 h after the infection with each bacterial strain, in September and in December, did not shown significant difference between the L-leucine-aminopeptidase activity measured in the unchallenged group and the infected groups, respectively (Table 3). The activity for the unchallenged group 24 h after the challenge ranged from 25 to 131 mU.mg⁻¹ proteins in September and from 27 to 97 mU.mg⁻¹ proteins in December and the values of the infected groups ranged from 26 to 156 mU.mg⁻¹ proteins in September and from 18 to 51 mU.mg⁻¹ proteins in December (Tables 8 and 9). No significant difference between the unchallenged group and the infected groups has been observed 48 h after the infections, in September and in December (Table 3). The values of the unchallenged group range from 25 to 51 mU.mg⁻¹ proteins in September and from 13 to 30 mU.mg⁻¹ proteins in December and for the infected groups, the values range from 18 to 95 mU.mg⁻¹ proteins in September and from 18 to 46 mU.mg⁻¹ proteins in December (Table 10 and 11).

ProPhenoloxydase-like activity

No significant differences have been observed between the unchallenged group and the infected groups 24 h and 48 h after the challenge (Table 3). The mean values for proPhenoloxydase-like activity of the unchallenged group 24 h after the infection ranged from 6 to 7 U.mg⁻¹ proteins in September and from 5 to 16 U.mg⁻¹ proteins in December. The values for the infected group ranged from 4 to 12 U.mg⁻¹ proteins in September and from 5 to 17 U.mg⁻¹ proteins in December, as reported in Tables 8 and 9. After 48 h, the mean values for the unchallenged group range from 2 to 7 U.mg⁻¹ proteins in September and from 5 to 18 U.mg⁻¹ proteins in December. For the infected group, the mean values for the proPO-like for the unchallenged group range from 2 to 9 U.mg⁻¹ proteins in September and from 5 to 18 U.mg⁻¹ proteins in December (Table 10 and 11).

Acid phosphatase activity

The acid phosphatase activity was not affected by challenges whatever the strain and the number of bacteria (table 3). The values of AP activity presented a high variation, as reported in tables 5 and 7. Values of unchallenged group ranged from 10 to 90 nmol.mg⁻¹ proteins and from 3 to 108 nmol.mg⁻¹ proteins in the infected group 24 h after the infection (Tables 8 and 9). After 48 h, the value in September for the unchallenged group range from 39 to 88 nmol.mg⁻¹ proteins and from 34 to 108 nmol.mg⁻¹ proteins for the infected groups (Table 10). In December, the values range from 21 to 69 nmol.mg⁻¹ proteins for the unchallenged group and from 8 to 52 nmol.mg⁻¹ proteins for the infected groups (Table 11).

1.4 DISCUSSION

This study had the objectives to assess the effects of exogenous bacteria as the fecal indicators *E. coli* and *E.faealis* on the immune response of *Mytilus edulis* in comparison to the effect of a non- pathogenic indigenous strain of *V. splendidus*. To

assess the influence the injection the immune responses, we firstly made sure that immune parameters of non-injected mussels were different than unchallenged mussels (infected with sea water). Our results showed that there was no significant difference between the non-injected group and the unchallenged group whatever the cellular or the humoral parameter measured. However, no effect on cellular and humoral immunity were observed in mussels challenged with *E.coli*, *E. faecalis* and *Vibrio splendidus*, whatever the bacterial concentration injected in mussels. Nevertheless, the high viability of haemocytes and their good phagocytic capacity observed in all groups may reflect that immune capacity of the mussel was good enough to interact with bacteria during the challenge. Also, this immune capacity remained the same regardless the physiological state of mussels. The physiological state is evaluated with the gonado-somatic index which is expressed by the percentage of the dry weight of the mantle from the total dry weight of the mussels. In September and December, the mussels are not in spawning period, where the immune system is suppressed due to the high energetic demands. (Lemaire *et al.*, 2006) That means that the results have not been influenced by spawning mussels. However, the index showed that the mussels were not in the same physiological state in September and December (12% in September and 22% in December). This results from the fact that in December, mussels accumulate reserves of energy in anticipation to the development of gametes in the spring (Gauthier-Clerc *et al.*, 2007). Although this demand of energy could have had an influence on the immunity of mussels, results indicated that their change of physiological state did not influence their immune response.

Moreover, we can also highlight that our results were similar for all challenges although *V. splendidus* and *E.coli* are Gram-negative bacteria and *E. faecalis* is a Gram-positive bacteria. Since Gram-positive bacteria have longer survival rate in sea-water than gram-negative bacteria (Hurst *et al.*, 2002) and their depuration time by mussels is longer (Roslev *et al.*, 2009), we may have expected to observe a different immune response. In addition, their recognition motifs located on their membrane, which allow haemocytes to initiate the immune response, are different and may have induced a

different immune response of mussels depending on the interaction pathway of the haemocytes with the bacteria (Beutler, 2004; Perry *et al.*, 2004; Wedenmaier & Peschel, 2008).

Hence, we have to highlight the fact that the bacterial concentrations used in our study (between 10^2 and 10^4 bacteria injected) were much lower than the concentrations mostly use for *in vivo* infection of bivalves which can reach between 10^6 and 10^9 bacteria mL^{-1} (Araya *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2009; Blaise *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2003). As an exemple, the *in vivo* challenge of *Mya arenaria* with the same strain of *V. splendidus* used in our study, Mateo *et al.* (2010) induce an increase of the number of hemocytes as well as a change in the morphology of hemocytes 24 h after the infection (Mateo, 2010). However, the amount of bacteria used by Mateo (2010) was about $4.5 \cdot 10^6$ per g of clam, which is much higher than what we used in our study. The low amount of bacteria that we use may explain the absence of immune effect during our trials is since bacteria are part of the natural flora of mussels. It has been shown that in oysters, there is naturally between 10^2 and 10^4 cultivable bacteria per mg of tissues (Saulnier *et al.*, 2010). Bacteria are also present in the hemolymph of healthy mussels, including *Vibrio* species (De Decker & Saulnier, 2011). Then infection with exogenous bacteria during our study may have been managed by mussels as bacteria of their natural flora. In addition, this little amount of bacteria injected in a living mussel may have been rapidly depurated since *Mytilus edulis* can degrade 10^9 bacteria per hour (Birkbeck & McHenry, 1982). In addition, observed depuration mostly process during the first 24 h of infection (Roslev *et al.*, 2009) although *E. faecalis* can persist 168 h in mussel flesh. Bactericidal properties of haemocytes during the first 24 h post-infection were also observed in several *in vitro* challenge of haemocytes from different bivalves: *Tegillarca granosa* infected with *Vibrio parahaemolyticus* (Bao *et al.*, 2011), *Mytilus galloprovincialis* infected with *V. anguillarum* and *M. lysodeikticus* (Costa *et al.*, 2009) and *Mytilus edulis* infected with a virulent strain of *V. splendidus* (Tanguy *et al.*, 2011). This may simply explain why we did not observed any immune effect in comparison to

immunosuppressive or inductive effect observed by other authors in *Mytilus spp.* or other bivalves.

1.5 CONCLUSION

For the first time, we conducted an *in vivo* infection with realistic bacterial concentrations as reported in coastal environment. Our purpose was to observe a potential chronic effect of the exposure of mussels to enteric bacteria originating from pulsed and chronic sewage discharges into coastal environments and our results show that the mussels are able to deal with such bacteria challenges without any negative and chronic effect on their immune competency. This allows us to say that the presence of exogenous bacteria of fecal origin in coastal marine environments, where are located the mussel farms does not impair the immunocompetency of mussel. These results are positive for mussel farms, where a decrease in immune capacity could make them more vulnerable to infections by pathogens, which could have significant repercussions on the mussel industry.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Cette étude a permis d'évaluer la réactivité de l'immunocompétence chez des adultes *M. edulis* en présence de bactéries exogènes Gram-négatives et Gram-positives, soit *E. coli* et *E. faecalis* et ce, à des concentrations similaires à celles retrouvées dans l'environnement en cas de déversement des eaux usées dans le milieu marin. Les effets des infections effectuées avec les souches exogènes ont été comparés à ceux d'une souche indigène de référence non pathogène de *V. splendidus*. Il a déjà été démontré que *V. splendidus* n'a aucun effet sur la capacité phagocytaire, le nombre d'hémocytes, le stress oxydatif et sur l'expression de certains gènes liés à l'immunité (Tanguy *et al.*, 2011). De plus, les concentrations bactériennes et la méthode d'infection utilisées (*in vivo*) ont permis d'avoir une idée réaliste des effets des bactéries exogènes *E. coli* et *E. faecalis* sur l'immunocompétence des moules dans l'environnement. Cette étude a également contribué à la compréhension de la défense immunitaire des bivalves dans des conditions comparables à celles rencontrées lors de déversements ponctuels des eaux usées dans l'environnement marin. Des études comme celle-ci recréent le plus fidèlement possible les conditions environnementales lors de challenges bactériens ou d'exposition à des contaminants chimiques en laboratoire, pourraient s'avérer être un bon complément aux études *in situ*. En effet, cela permettrait d'isoler les effets individuels d'un facteur sur l'immunocompétence en standardisant les méthodes d'expositions (e.g. concentration de contaminants chimiques, nombre de bactéries, etc.) ce qui aide grandement la compréhension de ce qui se passe dans le milieu naturel.

Il est difficile de recréer parfaitement une exposition *in situ* de moules face à des bactéries en laboratoire, mais plusieurs méthodes ont été mises en place afin de s'en rapprocher au maximum. Tout d'abord, les infections doivent se faire avec une concentration bactérienne déterminée. Il existe pour ce faire plusieurs méthodes. La méthode par balnéation (où les moules sont infectées par des bactéries introduites dans l'eau) est plus proche de ce qui se passe à l'état naturel mais ne conduit pas toujours à

des mortalités lors d'infections avec des pathogènes, ce qui illustre la complexité de ce type d'infection. De plus, cette méthode n'offre que très peu de reproductibilité (De Decker & Saulnier, 2011). La méthode par injection permet de standardiser les infections et de connaître plus exactement la quantité de bactéries mise en contact avec le système immunitaire, ce qui est plus souhaitable lorsque les objectifs sont de connaître les effets de bactéries à des concentrations précises. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser cette méthode.

L'interprétation des données immunologiques récoltées avec un modèle d'infection *in vivo* doit se faire avec prudence. En effet, plusieurs facteurs doivent être pris en considération tels que les conditions des moules au moment de l'étude, la présence initiale de bactéries à l'intérieur des moules et les différents facteurs abiotiques pouvant stresser les moules durant l'expérience (e.g. la température de l'eau, le taux d'oxygène dans les bassins, etc.). Ces facteurs peuvent rendre l'élaboration d'un modèle d'infection *in vivo* plus difficile et il est bien important de les considérer lors de l'interprétation des résultats. Toutefois, ce type de modèle offre un portrait beaucoup plus réaliste des interactions hôtes-bactéries que les modèles *in vitro*.

D'autres facteurs à prendre en considération sont le taux de filtration et le temps de résidence des bactéries à l'intérieur des moules qui ont été considérés de façon seulement théorique et qui n'ont pas été calculés spécifiquement sur nos moules et à nos conditions expérimentales. Plusieurs raisons techniques, dont entre autre la faible quantité de bactéries utilisées, ont fait en sorte que ces paramètres n'ont pas été mesurés.

Les résultats démontrent que dans nos conditions expérimentales, le système immunitaire de *M. edulis* n'est pas affecté par la présence de ces bactéries exogènes. La compréhension de la réaction immunitaire chez *M. edulis* en réponse aux différents stress environnementaux est très importante puisque ces stress peuvent augmenter l'incidence de maladies chez les bivalves en affectant le système immunitaire (Coles & Pipes, 1994; Wootton *et al.*, 2006). Plusieurs facteurs environnementaux tels qu'une augmentation de la température et une diminution de la salinité, couplés à leur période de

reproduction (qui demande beaucoup d'énergie) les rendent plus vulnérables aux contaminations par les virus et par les bactéries pathogènes (Cochennec-Laureau *et al.*, 2011). Nos résultats ont démontré que la présence des bactéries exogènes *E.coli* et *E.faecalis* ne font pas partie de ces facteurs et ne rendent pas les moules plus vulnérables aux maladies dans le contexte d'une exposition à des concentrations comparables à celles retrouvées dans l'environnement lors de contaminations ponctuelles par les eaux usées.

Perspectives

D'autres études seront indispensables afin de mieux comprendre la réaction du système immunitaire de la moule bleue en présence de bactéries indigènes ou exogènes aux environnements côtiers marins. Cette étude a démontré que les souches exogènes *E.coli* et *E.faecalis* et la souche indigène non-pathogène *V. splendidus* n'ont pas affecté le système immunitaire des moules bleues adultes en dehors de leur période de reproduction. Cependant, on ne connaît pas leurs effets sur les adultes pendant leur période de reproduction, au moment où ils sont plus vulnérables aux infections (Delaporte *et al.*, 2006; Oliver & Fisher, 1999). Une observation de la réaction immunitaire de la moule bleue face à des bactéries exogènes tout au long de l'année pourrait donc permettre d'évaluer les variations de sa capacité immunitaire tout au long de son cycle reproducteur. De plus, il existe d'autres paramètres immunitaires qui auraient pu potentiellement permettre de détecter des variations dans l'activité des hémocytes des moules infectées et qui n'ont pas été investigués lors de cette étude. La forme des hémocytes, l'adhérence des hémocytes, l'apoptose et l'utilisation de stimulants de la flambée oxydative (*e.g.* particules de zymosan) sont des exemples de paramètres qui sont également utilisés lors d'études sur l'immunocompétences chez les bivalves et qui n'ont pas été utilisés lors de cette présente études pour des raisons techniques (Birrer *et al.*, 2012; Lambert *et al.*, 2007; Mateo, 2010). La régulation de l'expression de certains gènes qui encode des protéines impliquées dans la réponse immunitaire (telles que les peptides antimicrobiens, les lectines etc.) est un paramètre qui est également utilisé dans plusieurs études immunologiques. La régulation de gènes

permet de mettre en évidence certains effets précoces de l'infection (Mateo, 2010; De Decker & Saulnier, 2011; Li *et al.*, 2010).

Il faut également souligner le fait dans cette étude, les paramètres immunitaires ont été mesurés sur l'ensemble des populations d'hémocytes sans considérer les différentes sous-populations. Une différenciation de ces différentes sous-populations par cytométrie en flux aurait toutefois permis de distinguer des variations de certains paramètres immunitaires à l'intérieur de celles-ci impossibles à détecter à l'intérieur de la population d'hémocytes totale.

Le rejet des eaux usées dans l'environnement est susceptible d'introduire dans l'environnement, en plus des bactéries indicatrices de pollution fécales, plusieurs contaminants chimiques, métaux lourds, produits pharmaceutiques, etc. (Mercier & Cooper, 2001). Plusieurs de ces éléments anthropiques exogènes qui sont en contact avec les moules sont potentiellement immunosuppresseurs et augmentent les risques de contaminations par des bactéries pathogènes pouvant être présentement dans leurs milieux (Akaishi *et al.*, 2007, Coles & Pipes, 1994, Gagnaire *et al.*, 2007; Hannam *et al.*, 2010). Des bactéries opportunistes telles que les *Vibrio* pourraient tirer profit de la présence d'éléments immunosuppresseurs pour exprimer leur potentiel virulent et infecter les moules. Des études utilisant un mélange de plusieurs souches bactériennes simultanément en plus de contaminants chimiques susceptibles de se retrouver dans l'environnement des moules permettraient d'obtenir des informations sur l'immunité de la moule bleue dans des conditions environnementales plus réalistes qu'avec des bactéries en culture pure.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKAISHI, F. M., S. D. ST-JEAN, F. BISHAY, J. CLARKE, I. D. S. RABITTO & C. A. D. O. RIBEIRO. 2007. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquatic Toxicology*, 82 (1): 1-14.
- ANDRÈS, E. & J. L. DIMARCQ. 2004. Peptides antimicrobiens cationiques : de l'étude de l'immunité innée à la production de médicaments. *La Revue de Médecine Interne*, 25 (9): 629-635.
- ANONYME. 2007. L'état de la mariculture au Québec. Ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation. 36 pp.
- ARAYA, M. T., F. MARKHAM, D. R. MATEO, P. MCKENNA, G. R. JOHNSON, F. C. J. BERTHE & A. SIAH. 2010. Identification and expression of immune-related genes in hemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*, challenged with *Vibrio splendidus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29 (4): 557-564.
- ASOKAN, R., M. ARUMUGAM & P. MULLAINADHAN. 1997. Activation of prophenoloxydase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus *Developmental and Comparative Immunology*, 21 (1): 1-12.
- ASPGC-PHAC. 2011. Page consultée en décembre 2011. *Vibrio cholerae*. Dans Agence de la Santé Publique du Canada. En ligne. www.phac-aspgc.gc.ca.
- AUFFRET, M. 1988. Bivalve Hemocyte Morphology. *American Fisheries Society, Special Publication*, 1: 169-177.
- AUFFRET, M., S. ROUSSEAU, I. BOUTET, A. TANGUY, J. BARON, D. MORAGA & M. DUCHEMIN. 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63 (3): 393-405.
- BAO, Y., Q. WANG, H. LIU & Z. LIN. 2011. A small HSP gene of bloody clam (*Tegillarca granosa*) involved in the immune response against *Vibrio parahaemolyticus* and lipopolysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*, 30: 729-733.
- BAYNE, B. L. 1976. *Marine mussels, their ecology and physiology*. Cambridge University Press, Melbourne: 482 pp.
- BEUTLER, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40 (12): 845-859.

- BIRKBECK, T. H. & J. G. MCHENERY. 1982. Degradation of bacteria by *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 72 (1): 7-15.
- BIRRER, S. C., T. B. H. REUSCH & O. ROTH. 2012. Salinity change impairs pipefish immune defence. *Fish & Shellfish Immunology*, 33 (6): 1238-1248.
- BLAISE, C., S. TROTTIER, F. GAGNÉ, C. LALLEMENT & P. D. HANSEN. 2002. Immunocompetence of Bivalve Hemocytes as Evaluated by a Miniaturized Phagocytosis Assay. *Environnemental Toxicology* 17: 160-169.
- BLAISE, C., S. TROTTIER, F. GAGNÉ, C. LALLEMENT & P. D. HANSEN. 2002. Immunocompetence of Bivalve Hemocytes as Evaluated by a Miniaturized Phagocytosis Assay. *Environ. Toxicol* 17: 160-169.
- BUSSELL, J. A., E. A. GIDMAN, D. R. CAUSTON, D. GWYNN-JONES, S. K. MALHAM, M. L. M. JONES, B. REYNOLDS & R. SEED. 2008. Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (*Linnaeus*) in response to lowered salinity and physical stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 358 (1): 78-85.
- CHU, F. E. 1988. Humoral Defense Factors in Marine Bivalves. *American Fisheries Society, Special Publication*, 18: 178-188.
- COCHENNEC-LAUREAU, N., J. P. BAUD, J. F. PEPIN, A. BENABDELMOUNA, P. SOLETCHEK, C. LUPO, C. GARCIA, I. ARZUL, P. BOUDRY, T. A. HUVE, F. PERNET, E. BACHERE, E. BEDIER, B. PETTON, F. GAUSSEM, J. Y. STANISIERE & L. DEGREMONT. 2011. Page consultée en septembre 2011. Les surmortalités des naissains d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas* : acquis des recherches en 2010. En ligne. <http://archimer.ilremer.fr/doc/00033/14423/>.
- COLES, J. A. & R. K. PIPES. 1994. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 4: 337-352.
- COSTA, M. M., M. PRADO-ALVAREZ, C. GESTAL, H. LI, P. ROCH, B. NOVOA & A. FIGUERAS. 2009. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish & Shellfish Immunology*, 26 (3): 515-523.
- DE DECKER, S. & D. SAULNIER. 2011. Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: Evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. *Fish & Shellfish Immunology*, 30 (2): 691-699.

- DE DONNO, A., D. LIACI, F. BAGORDO, F. LUGOLI & G. GABUTTI. 2008. *Mytilus galloprovincialis* as a Bioindicator of Microbiological Pollution of Coastal Water: A Study Conducted in the Salento Peninsula (Italy). *Journal of Coastal Research*, 24 216-221.
- DELAPORTE, M., P. SOUDANT, C. LAMBERT, J. MOAL, S. POUVREAU & J.-F. SAMAIN. 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 (1-4): 571-582.
- DFO, P. E. O. C. 2011. Page consultée en mai 2011. L'aquaculture au Canada, faits et chiffres. Dans *Pêches et Océans Canada*. En ligne. <http://www.dfompo.gc.ca/aquaculture/ref/stats/aqua-ff-fc-2009-fra.html>
- DUCHEMIN, M. B., M. AUFFRET, N. WESSEL, M. FORTIER, Y. MORIN, J. PELLERIN & M. FOURNIER. 2008. Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through *in vivo*, *in tubo* and *in vitro* exposures. *Environmental Pollution*, 153 (2): 416-423.
- FAO, O. D. N. U. P. L. A. E. L. A. 2011. Page consultée en mai 2011. « *Mytilus edulis* » Dans Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. : En ligne. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_edulis/fr#tcNA00EA.
- FENG, S. Y. 1988. Cellular Defense Mechanisms of Oysters and Mussels. *American Fisheries Society, Special Publication*, 18: 153-168.
- GAGNAIRE, B., M. GAY, A. HUVET, J.-Y. DANIEL, D. SAULNIER & T. RENAULT. 2007. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology*, 84 (1): 92-102.
- GARAY, E., A. ARNAU & C. AMARO. 1985. Incidence of *Vibrio cholerae* and Related Vibrios in a Coastal Lagoon and Seawater Influenced by Lake Discharges along an Annual Cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (2): 426-430.
- GARRIDO-PÉREZ, M. C., E. ANFUSO, A. ACEVEDO & J. A. PERALES-VARGAS-MACHUCA. 2008. Microbial indicators of faecal contamination in waters and sediments of beach bathing zones. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211 (5-6): 510-517.

- GAUTHIER-CLERC, S., G. TITA, F. BOURQUE, R. TREMBLAY, J. PELLERIN, M. FOURNIER, R. ST-LOUIS, É. PELLETIER & 2007. Comparaison de la gamétogénèse de la moule bleue (*Mytilus edulis*) en mer et en lagune aux Îles-de-la-Madeleine Rapport présenté au Ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation du Québec: 28 p.
- GIRARD, M., M. ROUSSY, F. COULOMBE, C. CAUVIER & N. MOISAN. 2008. Optimisation des opérations de dépuration en vrac des moules bleues de la baie de Gaspé par la réduction des débits de l'eau de mer à basse température. Rapport de recherche-développement pour le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, n° 169: 20 p.
- GONZALEZ, M., B. ROMESTAND, J. FIEVET, A. HUVET, M.-C. LEBART, Y. GUEGUEN & E. BACHÈRE. 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338 (2): 1089-1097.
- GOURDON, I., M. C. GUÉRIN, J. TORREILLES & P. ROCH. 2001. Nitric Oxide Generation by Hemocytes of the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide*, 5 (1): 1-6.
- GUEGUEN, Y., J.-P. CADORET, D. FLAMENT, C. BARREAU-ROUMIGUIÈRE, A.-L. GIRARDOT, J. GARNIER, A. HOAREAU, E. BACHÈRE & J.-M. ESCOUBAS. 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*, 303: 139-145.
- HANNAM, M. L., S. D. BAMBER, T. S. GALLOWAY, A. JOHN MOODY & M. B. JONES. 2010. Functional immune response in *Pecten maximus*: Combined effects of a pathogen-associated molecular pattern and PAH exposure. *Fish & Shellfish Immunology*, 28 (1): 249-252.
- HELLIO, C., A. BADO-NILLES, B. GAGNAIRE, T. RENAULT & H. THOMAS-GUYON. 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish and Shellfish Immunology*, 22: 433- 440.
- HINE, P. M. 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 9 (5): 367-385.
- HURST, J. C., R. L. CRAWFORD, G. R. KNUDSEN, M. J. MCINERNEY & L. D. STETZENBACH. 2002. *Manual of Environmental Microbiology*. Second Edition. ASM Press, Washington: 1137pp.

- IFREMER. 2012. Page consultée en avril 2012. La recherche en appui à la conchyliculture. En ligne.
<http://wwz.ifremer.fr/institut/content/download/53917/764149/file/Ifremer128.com.pdf>:
- ITOH, N. & K. G. TAKAHASHI. 2008. Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150 (4): 409-417.
- ITOH, N. & K. G. TAKAHASHI. 2009. A novel peptidoglycan recognition protein containing a goose-type lysozyme domain from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular Immunology*, 46 (8-9): 1768-1774.
- JACQUET, S., J. F. LENNON, D. MARIE & D. VAULOT. 1998. Picoplankton population dynamics in coastal waters of the northwestern Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography*, 43 (8): 1916-1931.
- KUCHEL, R. P., D. A. RAFTOS & S. NAIR. 2010. Immunosuppressive effects of environmental stressors on immunological function in *Pinctada imbricata*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29 (6): 930-936.
- LABREUCHE, Y., C. LAMBERT, P. SOUDANT, V. BOULO, A. HUVET & J.-L. NICOLAS. 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection*, 8 (12-13): 2715-2724.
- LAMBERT, C., P. SOUDANT, G. CHOQUET & C. PAILLARD. 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish and Shellfish Immunology*, 15: 225-240.
- LAMBERT, C., P. SOUDANT, L. DÉGREMONT, M. DELAPORTE, J. MOAL, P. BOUDRY, F. JEAN, A. HUVET & J.-F. SAMAIN. 2007. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture*, 270 (1-4): 276-288.
- LANE, E. & T. H. BIRKBECK. 2000. Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. *Journal of Fish Diseases*, 23 (4): 275-279.

- LE FOLL, F., D. RIOULT, S. BOUSSA, J. PASQUIER, Z. DAGHER & F. LEBOULENGER. 2010. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish & Shellfish Immunology*, 28 (2): 372-386.
- LEBARON, P., P. SERVAIS, A. C. BAUDOUX, M. BOURRAIN, C. COURTIES & N. PARTHUISOT. 2002. Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry *Aquatic Microbial Ecology*, 28: 131-140.
- LEMAIRE, N., J. PELLERIN, M. FOURNIER, L. GIRAULT, E. TAMIGNEAUX, S. CARTIER & E. PELLETIER. 2006. Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *mytilus spp.* from farm sites of eastern Quebec. *Aquaculture*, 261 (2): 729-751.
- LI, B., B. CHEN, Z. QI, Z. JIANG, J. ZHANG & J. FANG. 2010 a. Relationship between differential retention of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* and variations in enzyme activity in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Marine Pollution Bulletin*, 60 (9): 1600-1605.
- LI, H., P. VENIER, M. PRADO-ALVÁREZ, C. GESTAL, M. TOUBIANA, R. QUARTESAN, F. BORGHESAN, B. NOVOA, A. FIGUERAS & P. ROCH. 2010 b. Expression of *Mytilus* immune genes in response to experimental challenges varied according to the site of collection. *Fish & Shellfish Immunology*, 28 (4): 640-648.
- LI, H., P. VENIER, M. PRADO-ALVÁREZ, C. GESTAL, M. TOUBIANA, R. QUARTESAN, F. BORGHESAN, B. NOVOA, A. FIGUERAS & P. ROCH. 2010. Expression of *Mytilus* immune genes in response to experimental challenges varied according to the site of collection. *Fish & Shellfish Immunology*, 28 (4): 640-648.
- LI, W. K. W. & P. M. DICKIE. 2003. Page consultée en mai 2011. Distribution et Abondance des Bactéries dans L'Océan. En ligne. http://www2.mar.dfo-mpo.gc.ca/science/review/1996/Li/Li_f.html.
- LICHTMAN, A. H. & A. K. ABBAS. 2005. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. Elsevier, Paris: 299 pp.
- MARINO, A., L. LOMBARDO, C. FIORENTINO, B. ORLANDELLA, L. MONTICELLI, A. NOSTRO & V. ALONZO. 2005. Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-O1 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal of Food Microbiology*, 99 (3): 281-286.

- MATEO, D. R. 2010. In vivo model of the response of soft-shell clam (*Mya arenaria*) haemocytes differentially induced by two strains of *Vibrio splendidus*. Thèse de doctorat University of Prince Edward Island, Charlottetown: 229 p.
- MATOZZO, V., M. MONARI, J. FOSCHI, Z. SERRA, G. P. NETTI, O. CATTANI & M. G. MARIN. 2007. Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I: alterations in immune responses *Marine Biology*, 151: 1051-1058.
- MERCIER, V. & L. COOPER. 2001. État des effluents urbains au Canada. Pour Environnement Canada. 71 p.
- MUNARI, M., V. MATOZZO & M. G. MARIN. 2011. Combined effects of temperature and salinity on functional responses of haemocytes and survival in air of the clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30 (4-5): 1024-1030.
- MUNOZ, P., J. MESEGUER & M. A. ESTEBAN. 2006. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 12-19.
- MYRAND, B., H. GUDERLEY & J. H. HIMMELMAN. 2000. Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen Islands, southern Gulf of St. Lawrence *Marine Ecology Progress Series*, 197: 193-207.
- NICOLAS, P. 2009. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS Journal*, 276 (22): 6483-6496.
- OLIVER, L. M. & W. FISHER. 1999. Appraisal of perspective bivalve immunomarkers. *Biomarkers*, 4 (6): 510-530.
- OUBELLA, R., C. PAILLARD, P. MAES & M. AUFFRET. 1994. Changes in Hemolymph Parameters in the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) Following Bacterial Challenge. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64: 33-38.
- OWESON, C. & B. HERNROTH. 2009. A comparative study on the influence of manganese on the bactericidal response of marine invertebrates. *Fish & Shellfish Immunology*, 27 500-507.
- PARISI, M.-G., H. LI, L. B. P. JOUVET, E. A. DYRYNDA, N. PARRINELLO, M. CAMMARATA & P. ROCH. 2008. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. *Fish & Shellfish Immunology*, 25 (6): 834-840.

- PARK, H., I.-Y. AHN, J. K. LEE, S. C. SHIN, J. LEE & E.-J. CHOY. 2009. Molecular cloning, characterization, and the response of manganese superoxide dismutase from the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* to PCB exposure. *Fish & Shellfish Immunology*, 27 (3): 522-528.
- PAUL-PONT, I., P. GONZALEZ, M. BAUDRIMONT, F. JUDE, N. RAYMOND, L. BOURRASSEAU, N. LE GOÏC, F. HAYNES, A. LEGEAY, C. PAILLARD & X. DE MONTAUDOUIN. 2010. Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the marine bivalve *Cerastoderma edule*. *Marine Pollution Bulletin*, 60 (4): 515-525.
- PERRY, J. J., J. T. STALEY & S. LORY. 2004. *Microbiologie*. Dunod, Paris: 891 pp.
- PIPE, R. K. 1990. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res*, 261: 261-268.
- PIPE, R. K. 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 16: 111-122.
- POTASMAN, I., A. PAZ & M. ODEH. 2002. Infectious Outbreaks Associated with Bivalve Shellfish Consumption: A Worldwide Perspective. *Clinical Infectious Diseases*, 35: 921-928.
- POTÉ, J., N. GOLDSCHIEDER, L. HALLER, J. ZOPFI, F. KHAJEHNOURI & W. WILDI. 2009. Origin and spatial-temporal distribution of faecal bacteria in a bay of Lake Geneva, Switzerland. *Environmental Monitoring and Assessment*, 154 (1): 337-348.
- PRUZZO, C., G. GALLO & L. CANESI. 2005. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environmental Microbiology*, 7 (6): 761-772.
- ROPME, R. O. F. T. P. O. T. M. E. 2010. Page consultée en mai 2011. Mussel watch program (MWP). Dans Regional Organization for the Protection of the Marine Environment. En ligne. <http://www.ropme.com/program3.html>.
- ROSLEV, P., L. IVERSEN, H. L. SONDERBO, N. IVERSEN & S. BASTHOLM. 2009. Uptake and persistence of human associated *Enterococcus* in the mussel *Mytilus edulis*: relevance for faecal pollution source tracking. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 944-953.

- SAULNIER, D., S. DE DECKER, P. HAFFNER, L. COBRET, M. ROBERT & C. GARCIA. 2010. A Large-Scale Epidemiological Study to Identify Bacteria Pathogenic to Pacific Oyster; *Crassostrea gigas* and Correlation Between Virulence and Metalloprotease-like Activity. *Microbial Ecology*, 59 (4): 787-798.
- SEO, J. K., J. M. CRAWFORD, K. L. STONE & E. J. NOGA. 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American Oyster *Crassostrea virginica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338: 1998-2004.
- SÖDERHÄLL, K. & L. CERENIUS. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10 (1): 23-28.
- TANGUY, M., A. SIAH, J.-M. DANGER, M. FOURNIER & S. GAUTHIER-CLERC. 2011. Modèle *in vitro* d'interaction des hémocytes de *Mytilus edulis* avec *Vibrio splendidus*. Affiche présentée dans le cadre d'ÉCOBIM Institut Maurice-Lamontagne (Mont-Joli): 7 juin 2011.
- TRAVERS, M.-A., N. LE GOÏC, S. HUCHETTE, M. KOKEN & C. PAILLARD. 2008. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 25 (6): 800-808.
- TREMBLAY, R., B. MYRAND, J.-M. SEVIGNY, P. BLIER & H. GUDERLEY. 1998. Bioenergetic and genetic parameters in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* to summer mortality. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 221 27-58.
- TREMBLAY, R., M. ROUSSY & C. M. 2004. Modélisation du potentiel d'épuration de la moule bleue (*Mytilus edulis* SPP.) en eau froide et en réaction à un choc thermique. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'alimentation, Cahier d'information 143: 30 pp.
- WEDENMAIER, C. & A. PESCHEL. 2008. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 276-287.
- WELLS, P. G. 2003. State of the marine environment reports, a need to evaluate their role in marine environmental protection and conservation. *Marine Pollution Bulletin*, 46 (10): 1219-1223.
- WOOTTON, E. C., E. A. DYRYNDA, R. K. PIPE & N. A. RATCLIFFE. 2003. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquatic Toxicology*, 65 (1): 13-25.

- WOOTTON, E. C., E. A. DYRYNDA & N. A. RATCLIFFE. 2006. Interaction between non-specific electrostatic forces and humoral factors in haemocyte attachment and encapsulation in the edible cockle, *Cerastoderma edule*. *The Journal of Experimental Biology*, 209: 1326-1335.
- WRIGHT, A. C., R. T. HILL, J. A. JOHNSON, M. C. ROGHMAN, R. R. COLWELL & J. G. MORRIS JR. 1996. Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay *Applied and Environmental Microbiology* 62 (2): 717.

