



Effets apoptotiques du dinoflagellé *Alexandrium catenella* et de ses toxines sur les cellules immunitaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implications dans la susceptibilité de l'huître aux vibrioses

Céline Abi-Khalil

► To cite this version:

Céline Abi-Khalil. Effets apoptotiques du dinoflagellé *Alexandrium catenella* et de ses toxines sur les cellules immunitaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Implications dans la susceptibilité de l'huître aux vibrioses. Evolution [q-bio.PE]. Université de Montpellier, 2016. Français. NNT: . tel-01450626

HAL Id: tel-01450626

<https://theses.hal.science/tel-01450626>

Submitted on 31 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

Préparée au sein de l'école doctorale
**Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau
(GAIA)**

Et des unités de recherche
UMR 9190, Biodiversité marine, Exploitation et Conservation (MARBEC)
UMR 5244, Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements (IHPE)

Spécialité : **Ecologie, Evolution, Ressources Génétiques,
Paléobiologie**

Présentée par **Celina ABI KHALIL**

**Effets apoptotiques du dinoflagellé *Alexandrium
catenella* et de ses toxines sur les cellules
immunitaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.
Implications dans la susceptibilité de l'huître aux
vibrioses.**

Soutenue le 15/11/2016 devant le jury composé de



Mme Christine COUSTAU, Directrice de Recherche, CNRS
M. Rodolphe LEMEE, Maître de conférences, Université Pierre et
Marie Curie
M. Marc BOUVY, Directeur de Recherche, IRD

M. Zouher AMZIL, Cadre de Recherche, Ifremer
Mme Delphine DESTOUMIEUX- GARZÓN, Directrice de Recherche,
CNRS
M. Jean-Luc ROLLAND, Cadre de Recherche, Ifremer

M. Mohamed LAABIR, Maître de conférences, Université de
Montpellier

Rapporteur

Rapporteur
Examineur,
Président du jury
Examineur

Examineur
Co- encadrant
de thèse
Directeur de
thèse, Invité

Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans la contribution et la collaboration de nombreuses personnes. Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Je remercie Madame Christine Coustau et Monsieur Rodolphe Lemée qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse. Je tiens également à remercier Madame Delphine Destoumieux-Garzón et Messieurs Zouher Amzil, Marc Bouvy et Jean-Luc Rolland pour avoir accepté d'être membres de ce jury.

Je remercie Messieurs Guillaume Mitta et Yannick Gueguen pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire « Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnement » (UMR5244), mais aussi Messieurs Laurent Dagorn, Jean-Marc Fromentin, Thierry Bouvier et Madame Catherine Aliaume au sein du laboratoire « Biodiversité Marine, Exploitation et Conservation » (UMR9190). Je remercie également Messieurs Marc Trousselier et Marc Bouvy qui dirigeaient l'UMR « Ecologie des systèmes marins côtiers » dans laquelle j'ai débuté cette thèse.

Je remercie l'Université de Montpellier (Ecole Doctorale GAIA : Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau) de m'avoir accordé un financement pour ce travail. Je remercie également le programme National Ecosphère Continentale et Côtière pour les financements attribués aux projets Apotox et Intervibrio dans lesquels s'est largement inscrite cette thèse.

Je remercie Messieurs Mohamed Laabir et Jean-Luc Rolland d'avoir accepté d'encadrer cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement la responsable de l'équipe MIMM, Madame Delphine Destoumieux-Garzón pour ses conseils et sa pédagogie. Merci de m'avoir accompagnée et suivie de près durant ma dernière année de thèse. Tes compétences et ta rigueur scientifique m'ont beaucoup appris. Je t'exprime également toute ma reconnaissance pour la relecture et la correction de ce manuscrit.

Je remercie Messieurs Zouher Amzil, Eric Abadie, Darren Finkelstein, Justin Du Bois et Madame Genevieve Conéjéro pour leur collaboration. Je suis également reconnaissante à Phillipe Clair de la plateforme qPCR haut débit ainsi qu'à Elodie Jublanc et Chantal Cazevielle de la plateforme Montpellier RIO Imaging et à Evelyse Grousset de la plateforme d'histologie de MARBEC.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres de l'équipe MIMM pour leur accueil chaleureux et les moments agréables passés ensemble : Guillaume Mitta, Yannick Gueguen, Delphine Destoumieux-Garzón, Jean-Luc Rolland, Marc Leroy, Philippe Haffner, Agnès Vergnes, Julien de Lorgeril, Jean-Michel Escoubas, Thierry Noël, Arnaud Lagorce, Kelly Brenner, Tristan Rubio, Maxime Lafont, Samuel Dupont, Aude Lucasson, Dalila Henni et ceux qui ne sont plus au laboratoire Audrey Vanhove, Aurore Poirier, Rafael Da Rosa, Carmen

Lopez-Joven, Rodolfo Rondon, Julie Nicod, Marta Torres Bejar et Danielle Ferraz Mello. Je remercie en particulier Evelyne Bachère, Caroline Montagnani et Guillaume Charrière pour leurs conseils précieux.

Je remercie tous les membres des laboratoires MARBEC et IHPE ainsi que Monsieur Stephen Baghdiguian de l'ISEM pour ses conseils scientifiques.

Je n'oublie pas Monsieur Mathieu Sicard qui m'a encouragée et soutenue durant les moments difficiles de cette thèse.

Je tiens également à remercier tous mes amis au Liban et plus particulièrement Vanessa et Lamia pour leur présence et leur soutien moral tout au long de ma thèse, mais aussi tous ceux que j'ai rencontrés en France de toute nationalité, et qui sont devenus des vrais amis et plus particulièrement Tristan, Carmen, Audrey et Aurore.

Mes pensées les plus sincères se tournent vers Gilles. Je te remercie infiniment. Tu m'as réconfortée dans les moments difficiles et tu m'as supportée et motivée pendant ces trois ans malgré la distance. Ta présence et ton soutien me sont précieux. Je me rends compte de la chance que j'ai de t'avoir.

Enfin, je remercie Maman, Papa et mon frère. Merci pour votre amour, votre soutien et votre stimulante fierté. Les mots sont faibles pour exprimer la force de mes sentiments et la reconnaissance que je vous porte. Maman, tu as toujours cru en moi et encouragée à atteindre mes objectifs. Merci d'avoir toujours été une mère exceptionnelle. Sans toi je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui. Papa, ta tendresse et ton soutien m'ont beaucoup réconfortée durant cette thèse. Mon frère, tu as toujours été mon héros qui fait tout pour me protéger et me rendre heureuse malgré les kilomètres qui nous séparent. Aujourd'hui vous venez du Liban pour partager ce moment de bonheur avec moi, permettez-moi de vous dire que vous êtes ma fierté et mon bonheur dans cette vie.

A Maman, Papa, et mon Frère

A mon Liban

« Tout ce que je sais, c'est que je ne sais rien »

Socrate

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES ABREVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	8
INTRODUCTION GENERALE	9
CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	12
I. LES EFFLORESCENCES D'ALGUES NUISIBLES	12
I.1 Généralités	12
a) Expansion globale	12
b) Impacts dans les zones côtières	13
a) Les microalgues toxiques et leurs toxines	15
I.2 Les microalgues productrices de toxines paralysantes.....	17
a) Les microalgues productrices.....	17
b) Les propriétés	19
c) La toxicologie : Effet chez l'homme et mode d'action	20
d) Les efflorescences de microalgues productrices de toxines paralysantes en Europe	21
I.3 Les efflorescences toxiques récurrentes d' <i>Alexandrium catenella</i> dans la lagune de Thau	22
I.3.1 La lagune de Thau	22
I.3.2 L'apparition d' <i>Alexandrium catenella</i> dans la lagune de Thau dans les années 90.....	24
a) Morphologie d' <i>Alexandrium catenella</i>	24
b) Cycle de vie d' <i>Alexandrium catenella</i>	25
c) <i>Alexandrium catenella</i> , des efflorescences récurrentes	27

I.3.3 Impact des microalgues toxiques sur la production conchylicole.....	28
II. L'HUITRE CREUSE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>.....	30
II.1 La physiologie de l'huître.....	30
II.2 Le processus digestif de l'huître	31
II.3 Le système immunitaire de l'huître	32
II.3.1 Les cellules immunitaires	33
II.3.2 Les composants plasma-solubles	34
II.3.3 Les réactions immunitaires de l'huître.....	35
II.3.3.1 Les mécanismes de la reconnaissance du non-soi.....	35
II.3.3.2 Les voies de signalisation	37
II.3.3.3 Les réactions de défense	39
a) La phagocytose.....	39
b) Les protéines et peptides antimicrobiens.....	41
c) Les protéases et les inhibiteurs de protéases	42
d) Les lysozymes	42
II.4 Les mortalités des huîtres	43
a) Origine multifactorielle.....	43
b) Interactions des pathogènes avec le système immunitaire	44
II.5 Interaction des microalgues productrices de toxines paralysantes avec l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	46
II.5.1 Comportement alimentaire des huîtres face aux microalgues toxiques.....	46
II.5.2 L'effet des microalgues productrices de toxines paralysantes sur l'huître <i>Crassostrea gigas</i>	47
II.5.3 Le devenir des toxines paralysantes chez l'huître <i>Crassostrea gigas</i>	48
a) La répartition tissulaire des toxines paralysantes chez <i>Crassostrea gigas</i>	48
b) L'élimination des toxines paralysantes par détoxification chez <i>Crassostrea gigas</i>	49

III. L'APOPTOSE, UNE FORME DE LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE51

III.1 L'apoptose chez les vertébrés	54
III.1.1 Généralités.....	54
a) Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose.....	54
b) Les caspases.....	55
III.1.2 Les voies d'induction de l'apoptose	57
III.1.2.1 La voie extrinsèque de l'apoptose	57
III.1.2.2 La voie intrinsèque de l'apoptose	59
a) La voie intrinsèque caspases-dépendante	60
b) La voie intrinsèque caspases-indépendante.....	61
III.1.3 Les protéines régulatrices de l'apoptose.....	63
III.2 L'apoptose chez <i>Crassostrea gigas</i>	65
a) Les caspases.....	65
b) L'induction des voies apoptotiques.....	66
c) Les protéines anti-apoptotiques.....	67
d) L'induction de l'apoptose par les pathogènes de l'huître.....	68

CHAPITRE II : RESULTATS 70

SECTION A. L'exposition à la microalgue productrice de toxines paralysantes *Alexandrium catenella* augmente la susceptibilité de l'huître *Crassostrea gigas* aux vibrios pathogènes.....70

Publication 1 : Exposure to the Paralytic Shellfish Toxin Producer *Alexandrium catenella* Increases the Susceptibility of the Oyster *Crassostrea gigas* to Pathogenic Vibrios.....71

SECTION B. La toxine paralysante, la saxitoxine, entre dans le cytoplasme des cellules immunitaires de l'huître et induit leur mort selon une voie caspases-dépendante86

Publication 2 : The Paralytic Shellfish Toxin, Saxitoxin, enters the cytoplasm and induces caspase-dependent death of oyster immune cells.88

CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	116
CONCLUSION GENERALE	130
BIBLIOGRAPHIE.....	132
ANNEXE : A Feedback Mechanism to Control Apoptosis Occurs in the Digestive Gland of the Oyster <i>Crassostrea gigas</i> Exposed to the Paralytic Shellfish Toxins Producer <i>Alexandrium catenella</i>	162

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN/ARN	Acide DésoxyriboNucléique / Ribonucléique
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
AMP	AntiMicrobial Peptides
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenosine TriPhosphate
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BIR	Baculovirus IAP Repeats
BPI	Bactericidal Permeability Increasing protein
C1, 2, 3, 4	N-sulfocarbamoyltoxines 1, 2 3, 4
CAD	Caspase-Activated Dnase
CARD	CAspase Recruitment Domain
c-FLIP	cellular FLice Inhibitory Protein
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
Def	Defensin
DISC	Death Inducing Signaling Complex
ECP	ExtraCellular Products
EndoG	Endonucléase G
Ets	Extracellular traps
FADD	Fas Associated Death Domain
FAO	Food and Agriculture Organisation
GTX1, 2, 3, 4, 5, 6	Gonyautoxines 1, 2, 3, 4, 5, 6
HABs	Harmful Algal Blooms
IAP	Inhibitor of Apoptosis
ICAD	Inhibitor of Caspase-Activated Dnase
KDa	Kilo Dalton

LPS	LipoPolySaccharides
MAMPs	Microbial-Associated Molecular Patterns
MET	Microscopie electronique
MLS	Mitochondrial Localization Signal
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
OMV	Outer Membrane Vesicle
OsHV-1	Ostreid Herpesvirus type 1
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PG	Peptidoglycan
PRP	Pattern Recognition Protein
Prp	Proline rich peptide
PRR	Pattern Recognition Receptor
PSTs	Paralytic Shellfish Toxins
RE	Réticulum Endoplasmique
RESCO	RESeau d'Observations Conchylicoles
RGD	arginine(ARG);glycine(GLY);acide aspartique(ASP)
RNS	Reactive Nitritogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SMBT	Syndicat Mixte du Bassin de Thau
SOD	SuperOxyde Dismutase
STX	Saxitoxine
TIMP	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloprotease
TLR	Toll-like Receptor
TMRNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase TetraMethylRhodamine Nick End Labelling
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRADD	TNF Receptor Associated Death Domain
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
Uvs	Ultraviolets

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Augmentation mondiale du nombre de blooms détectés liés aux phycotoxines.	14
Figure 2. La structure chimique de la saxitoxine et de ses dérivés.	19
Figure 3. Le canal sodium voltage-dépendant.	21
Figure 4. La lagune de Thau avec les tables conchyliques.	23
Figure 5. L'algue productrice de toxines paralysante <i>Alexandrium catenella</i>	25
Figure 6. Le cycle de vie de <i>Alexandrium catenella</i>	26
Figure 7. L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	31
Figure 8. Les hémocytes de l'huître <i>Crassostrea gigas</i>	34
Figure 9. Représentation des voies de signalisation conservées chez l'huître <i>Crassostrea gigas</i>	39
Figure 10. Représentation schématique des principales étapes de la réponse immunitaire innée chez les huîtres.	43
Figure 11. Les changements morphologiques au cours de l'apoptose, l'autophagie et la nécrose.	53
Figure 12. Structure et mécanisme d'activation des caspases.	56
Figure 13. La voie extrinsèque de l'apoptose.	59
Figure 14. La voie intrinsèque de l'apoptose.	62
Figure 15. Représentation schématique des différents types de protéines de la famille Bcl-2.	64
Figure 16. Evaluation du nombre des hémocytes en apoptose chez des huîtres exposées pendant 48h à <i>Alexandrium catenella</i>	86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Récapitulatif des différentes espèces d'algues toxiques répertoriées, leurs toxines associées ainsi que leurs symptômes chez l'homme.	16
Tableau 2. Les différentes algues productrices de toxines paralysantes et leur répartition à travers le monde.	18
Tableau 3. Les principaux types de mort cellulaire avec les caractéristiques morphologiques et biochimiques principales associées.	52

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'ostréiculture occupe une place importante dans l'aquaculture marine mondiale avec une production annuelle d'huître s'élevant à 4,7 millions de tonnes en 2012 (FAO, 2016). En France, l'élevage de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est la principale activité aquacole avec une production annuelle avoisinant les 100 000 tonnes en 2012 (Comité National de la Conchyliculture, 2016).

L'ostréiculture française a connu une succession de phases de développement, de pleine exploitation, alternant avec des périodes de crises, le plus souvent liées à la surexploitation du milieu naturel et/ou l'apparition de maladies. Ainsi, suite à l'insuffisance de production des gisements naturels de l'huître plate *Ostrea edulis*, espèce endémique des côtes françaises, l'espèce *Crassostrea angulata* ou huître portugaise a été introduite en France à partir des années 1860. Cette espèce a toutefois été décimée, à la fin des années 1970, par un Iridovirus, responsable de la « maladie des branchies » (Comps and Duthoit, 1979). Pour relancer la production ostréicole française, l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* a donc été introduite au début des années 1970 à partir du Japon. Elle est aujourd'hui la principale espèce d'huître élevée dans le monde.

Depuis la dernière décennie, dans les écosystèmes marins côtiers, les élevages d'huîtres *C. gigas* subissent des épisodes de mortalité estivale affectant les huîtres juvéniles. Ces mortalités touchent de façon significative la production française avec des pertes variables selon les années. Ces mortalités récurrentes ont pour conséquence d'importantes pertes économiques au sein de la filière ostréicole. Un programme de recherche national multidisciplinaire dénommé MOREST (MORTalités ESTivales) a révélé que ces mortalités ont une étiologie multifactorielle impliquant les conditions environnementales, le statut physiologique et/ou génétique de l'huître et la présence de microorganismes pathogènes (Samain and McCombie, 2008). Depuis 2008, les phénomènes de mortalités estivales se sont intensifiés et apparaissent plus tôt dans l'année, dès le printemps, lorsque la température de l'eau atteint 16°C. Un virus de type Herpès nommé OsHV-1 (Segarra et al., 2010) ainsi que des souches de *Vibrio* du clade Splendidus (Lacoste et al., 2001, Gay et al., 2004b, Gay et al., 2004a, Saulnier et al., 2010) sont systématiquement retrouvés chez

les huîtres moribondes depuis 2008. Un nouveau variant du virus OsHV-1 (̄ var), apparu depuis 2008, pourrait contribuer à l'aggravation des mortalités (Segarra et al., 2010, Schikorski et al., 2011b, Segarra et al., 2014).

Parallèlement à ces phénomènes de surmortalité, les zones d'élevage d'huîtres sont soumises depuis quelques années à une expansion inquiétante des efflorescences de microalgues nuisibles (HABs : Harmful Algal Blooms) dont les espèces productrices de toxines. La lagune de Thau en particulier, moteur économique majeur de la région Languedoc Roussillon et principal site ostréicole en méditerranée, est confrontée régulièrement à de fortes mortalités des juvéniles de *C. gigas* mais également à des efflorescences récurrentes de la microalgue productrice de toxines paralysantes, *Alexandrium catenella* (Lilly et al., 2002, Laabir et al., 2011, Laanaia et al., 2013).

Malgré les travaux consacrés aux mortalités des huîtres, on ignore encore à l'heure actuelle le poids relatif des agents pathogènes, de la génétique des huîtres et des forçages environnementaux dans l'expression de pathogénèse. Notamment, les bases cellulaires et moléculaires de ces maladies multifactorielles restent encore méconnues. On ignore aussi très largement si les microalgues productrices de toxines paralysantes pourraient constituer un facteur aggravant lors de ces phénomènes de mortalités observés.

Cette thèse est consacrée à l'étude cellulaire de l'interaction entre la microalgue productrice de toxines paralysantes *A. catenella* et l'huître *C. gigas* confrontée à des vibrios pathogènes. L'objectif de ma thèse était (1) de déterminer si *A. catenella* peut augmenter la susceptibilité des huîtres aux vibrioses et (2) d'identifier les effets apoptotiques des toxines de cette microalgue sur les cellules immunitaires de *C. gigas*. Les travaux exposés dans cette thèse ont été réalisés au sein de l'équipe MIMM « Mécanismes d'Interaction et d'Adaptation en Milieu Marin » de l'UMR5244 IHPE « Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnement » sous la tutelle de l'Université de Montpellier, de l'Université de Perpignan Via Domitia, du CNRS, et de Ifremer ; et au sein de l'UMR9190 MARBEC « Biodiversité Marine, Exploitation et Conservation » sous la tutelle de l'Université de Montpellier, de l'IRD, du CNRS et de Ifremer.

Le premier chapitre de ma thèse présente une revue bibliographique sur (1) les microalgues productrices de toxines paralysantes dans le monde et plus particulièrement les efflorescences d'*A. catenella* dans la lagune de Thau, (2) l'huître creuse *C. gigas* et plus particulièrement son système immunitaire et ses interactions avec les microalgues productrices de toxines paralysantes, et (3) l'apoptose comme une forme de mort cellulaire programmée chez *C. gigas*.

Le deuxième chapitre concerne les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse. La section A décrit l'implication de la microalgue productrice de toxines paralysantes *A. catenella* dans l'augmentation de la susceptibilité des huîtres aux vibrios pathogènes. La section B présente la mise en évidence d'une cible des toxines paralysantes chez l'huître *C. gigas* ainsi que leurs effets apoptotiques sur les cellules immunitaires de l'huître.

Le troisième chapitre est une discussion générale qui propose des perspectives de recherche sur le rôle d'*A. catenella* dans les phénomènes de mortalités des huîtres et les mécanismes apoptotiques induits par les toxines paralysantes chez les huîtres.

CHAPITRE I:
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. LES EFFLORESCENCES D'ALGUES NUISIBLES

I.1 Généralités

a) Expansion globale

Dans les systèmes marins, la prolifération d'une ou de plusieurs espèces de microalgues peut entraîner des efflorescences nuisibles appelées « Harmful Algal Blooms » (HABs). Ce sont des phénomènes associés soit à une production de toxines par les cellules d'algues soit à une forte production de biomasse menant à des phénomènes d'hypoxie ou d'anoxie dans le milieu (Smayda, 1997). Ces HABs peuvent être la conséquence de phénomènes naturels tels que l'Upwelling mais aussi d'un changement du statut trophique pouvant être lié à l'eutrophisation (Al-Ghelani, 2005). Au cours des dernières décennies, une augmentation globale des HABs, en fréquence et en répartition géographique, est observée dans les écosystèmes marins (Glibert et al., 2005, Anderson et al., 2002)

Quatre processus principaux peuvent expliquer cette augmentation d'événements HABs. Tout d'abord, l'introduction accidentelle de kystes temporaires ou de résistance des microalgues nuisibles, en particulier les dinoflagellés, via les eaux de ballasts ou le transfert de mollusques d'une région à une autre ce qui favoriserait la dispersion de ces microalgues (Hallegraeff, 1995, Laabir and Gentien, 1999). L'eutrophisation des eaux côtières, impliquant un enrichissement de l'environnement en éléments nutritifs, provenant essentiellement des déchets industriels ou agricoles, est également une cause principale. Aussi, l'impact des changements climatiques avec notamment l'augmentation de la température favorisant le développement des microalgues benthiques thermophiles ainsi que l'augmentation des zones côtières exploitées à des fins aquacoles sont deux facteurs qui ne peuvent pas être ignorés. Une partie de cette augmentation serait également due à une sensibilisation scientifique accrue. La mise en place de réseaux de surveillance et l'amélioration des techniques de détection des espèces nuisibles et de leurs toxines ont sans doute contribué à augmenter le nombre d'épisodes toxiques révélés (Hallegraeff, 1993).

b) Impacts dans les zones côtières

Les algues toxiques sont normalement présentes en faibles abondances dans l'environnement sans impact sur les composantes d'un écosystème ou la santé humaine. Cependant, leur présence à des densités élevées se traduit par divers effets néfastes sur les mollusques, les poissons, les mammifères marins, les oiseaux et l'homme (Flewelling et al., 2005). De ce fait, les algues toxiques sont maintenant considérées comme un des principaux facteurs de risque environnementaux émergents. L'augmentation de la fréquence des blooms, leur amplitude ainsi que leur distribution géographique (Figure 1) peut être néfaste pour le fonctionnement du réseau trophique et les activités socio-économiques mais aussi peut présenter des risques non négligeables sur la santé humaine.

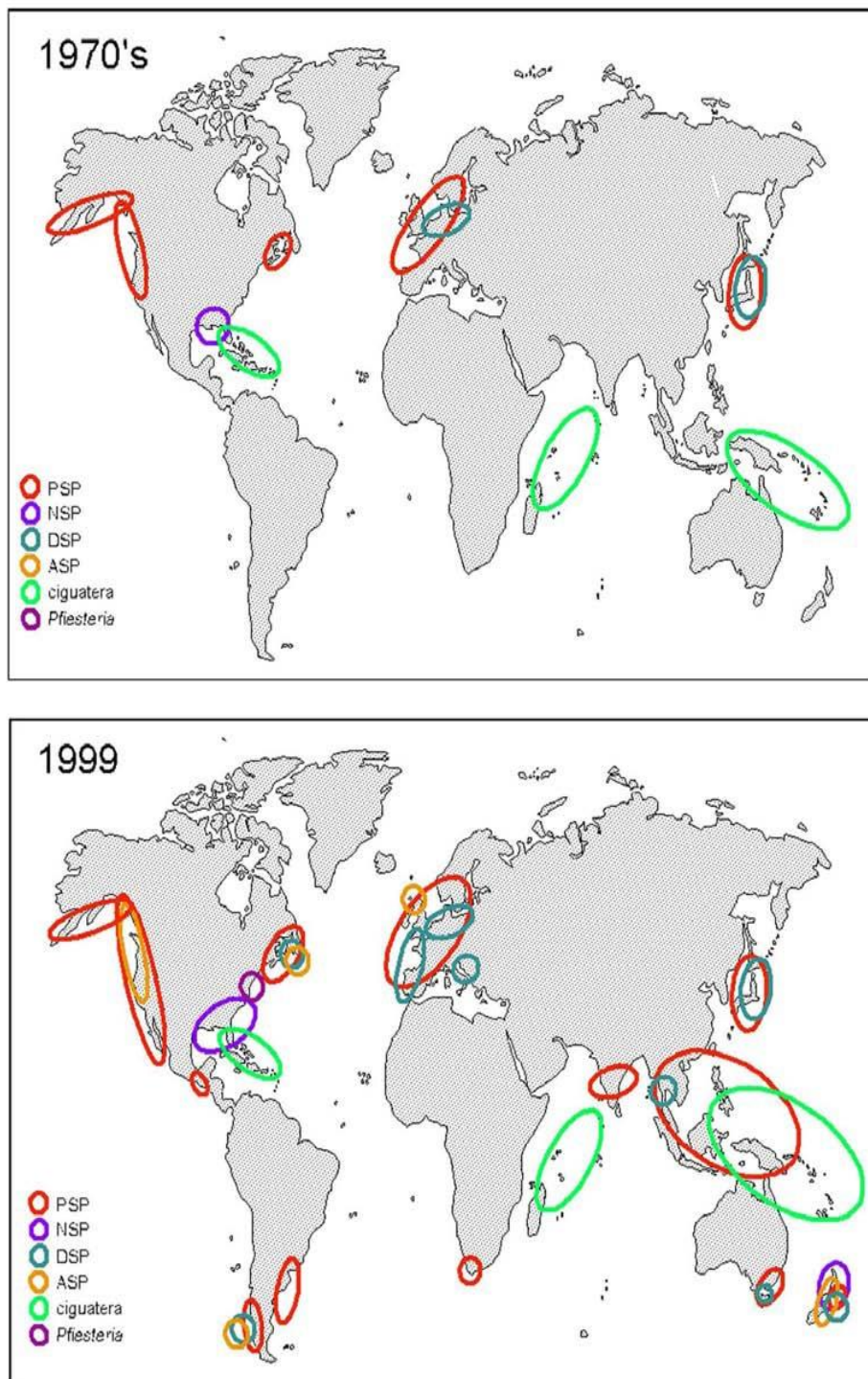


Figure 1. Augmentation mondiale du nombre de blooms détectés liés aux phycotoxines.
 Les secteurs encerclés indiquent les zones où les toxines ont été détectées à des niveaux suffisants induisant un impact sur la santé humaine ou sur l'environnement. D'après (Van Dolah, 2000), adapté dans (Gueguen, 2009).

En effet, le fonctionnement de l'écosystème de la zone impactée par les HABs peut être perturbé par l'accumulation d'une très forte quantité de matière organique produite par les espèces concernées. C'est le cas du Prymnesiophyte *Phaeocystis globosa* qui synthétise de fortes quantités de matière organique sous forme de mousse en Manche et Mer du Nord (Seuront et al., 2006).

Les HABs peuvent avoir également des conséquences économiques notamment des pertes financières dans la filière aquacole, le secteur touristique ainsi que dans la gestion de la crise (Anderson et al., 2000).

Le risque pour la santé humaine est dû à l'accumulation des toxines produites par certaines espèces le long du réseau trophique. L'intoxication chez l'homme résulte de la consommation de mollusques bivalves, crustacés ou poissons phytophages et carnivores ayant accumulé des toxines dans leur chair (Landsberg et al., 2006). Les symptômes caractéristiques varient selon les différents syndromes et la toxicité des toxines (Tableau 1).

a) Les microalgues toxiques et leurs toxines

Plus d'une douzaine de toxines synthétisées par des microalgues marines ont été identifiées comme responsables de la mort de nombreux vertébrés (poissons, oiseaux ou mammifères) (Flewelling et al., 2005). Les différents syndromes associés, bien que spécifiques à chaque type de toxine, partagent certains symptômes communs. Le tableau ci-dessous regroupe les différentes algues toxiques productrices de toxines et les symptômes liés au syndrome associé chez l'homme (Tableau 1).

Microalgues toxiques (Genres et espèces impliqués)	Phycotoxines	Risque sur la santé humaine			
		Syndrome	Symptômes digestifs	Symptômes neurologiques	Symptômes cardiovasculaires
<i>Alexandrium</i> <i>Gymnodinium</i> <i>Pyrodinium</i>	Saxitoxines	PSP	✓	✓	✓
<i>Karenia</i> <i>Chattonella</i> <i>Heterosigma</i>	Brevetoxines	NSP	✓	✓	✓
<i>Dinophysis</i> <i>Prorocentrum</i> <i>Protoceratium</i> <i>Lingulodinium</i>	Acide okadaïque Dinophysistoxines Yessotoxines	DSP	✓	✓	
<i>Gambierdiscus</i>	Ciguatoxines	CFP	✓	✓	
<i>Pseudo-nitzschia</i>	Acide domoïque	ASP	✓	✓	
<i>Azadinium spinosum</i>	Azaspiracide	AZP	✓	✓	
<i>Karenia selliformis</i> <i>Alexandrium</i> <i>ostenfeldii</i>	Gymnodimines Spirolides	FAT	?	✓	?
<i>Ostreopsis spp.</i>	Palytoxines Ostreocines	PLT	✓		✓

Tableau 1. Récapitulatif des différentes espèces d'algues toxiques répertoriées, leurs toxines associées ainsi que leurs symptômes chez l'homme.

Ce tableau est une synthèse des données répertoriées dans (Flewelling et al., 2005, Landsberg et al., 2005).

PSP : Paralytic Shellfish Poisoning, NSP : Neurotoxic Shellfish Poisoning, DSP : Diarrhetic Shellfish Poisoning, CFP : Ciguatera Fish Poisoning, ASP : Amnesic Shellfish Poisoning, AZP : Azaspiracid Shellfish Poisoning, FAT : Fast Acting Toxins, PLT : Palytoxines.

I.2 Les microalgues productrices de toxines paralysantes

Les toxines paralysantes causent des symptômes de type digestifs, neurologiques et cardiovasculaires. Elles peuvent affecter les humains, les oiseaux aussi bien que les mammifères marins. La première intoxication alimentaire par ces toxines date de 1793 dans le Pacifique Nord-Ouest du Nord de l'Amérique (Kao, 1993, Faber, 2012). Des intoxications en Amérique du Nord, en Europe, au Japon, en Afrique du Sud et en Nouvelle-Zélande ont rapidement ensuite suivi (Faber, 2012). Et ce n'est que dans les années 1930 qu'un bioessai sur souris a été mis en place pour éviter toute intoxication due à la consommation de mollusques bivalves (principal vecteur de la transmission à l'homme) contaminés par des toxines paralysantes. L'origine des intoxications a été ensuite découverte en 1957 par une équipe japonaise et la molécule active isolée à partir de la praire *Saxidomus giganteus*, qui a donné son nom à la saxitoxine (STX) (Amzil et al., 2001).

a) Les microalgues productrices

Les toxines paralysantes sont produites par des microalgues marines appartenant toutes à la classe des Dinoflagellés. Une vingtaine d'espèces de Dinoflagellés sont signalées comme étant les principales sources de toxines paralysantes. Elles sont réparties dans les trois genres suivants : *Alexandrium*, *Gymnodinium* et *Pyrodinium*.

Les toxines paralysantes peuvent également être produites par des cyanobactéries d'eau douce appartenant principalement au genre *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* et *Planktothrix*. A ce jour, aucune intoxication de l'homme par la STX présente dans l'eau douce n'a été mentionnée (van Apeldoorn et al., 2007). Le tableau ci-dessous détaille les différentes espèces productrices de toxines paralysantes ainsi que leur distribution dans le monde (Tableau 2).

	Ordre	Genre	Espèce	Distribution	Référence
Dinoflagellés marins	Gymnodiniales	<i>Gymnodinium</i>	<i>G. catenatum</i>	Côtes d'Amérique du Nord Afrique du Nord Europe du Sud	(Vale, 2008)
	Péridiniales	<i>Pyrodinium</i>	<i>P. bahamense</i> var. <i>compressum</i>	Zones tropicales à tempérées	(Landsberg et al., 2006)
		<i>Alexandrium</i> (refonte des genres <i>Gonyaulax</i> , <i>Protogonyaulax</i> et <i>Gessnerium</i>)	<i>A. minutum</i> <i>A. tamarense</i> <i>A. fundyense</i> <i>A. catenella (pacificum)</i>		(Abouabdellah et al., 2008) (Choi et al., 2006) (Twarog et al., 1972) (Laabir et al., 2011)
Cyanobactéries d'eau douce	Nostocales	<i>Anabaena</i>	<i>A. circinalis</i> <i>A. perturbata</i> var. <i>tumida</i> <i>A. spiroides</i> <i>A. lemmeronii</i> <i>A. flos-aquae</i>	Australie Lacs danois Amérique du Nord Portugal	(van Apeldoorn et al., 2007)
		<i>Cylindrospermopsis</i>	<i>C. raciborskii</i>	Brésil	(Saker et al., 2003)
	Oscillatoriales	<i>Planktothrix</i>	<i>Planktothrix spp</i>	Italie	(Pomati et al., 2000)

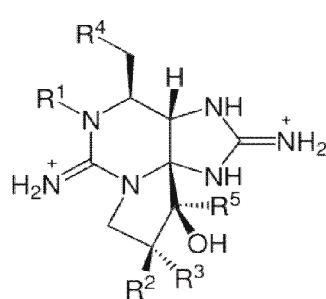
Tableau 2. Les différentes algues productrices de toxines paralysantes et leur répartition à travers le monde.

b) Les propriétés

Les toxines paralysantes sont une famille composée d'une vingtaine de molécules chimiquement proches dont la toxine de base est la saxitoxine. Ce sont des composés polaires de faible poids moléculaire, thermostables et stables en milieu acide. Par contre, leur sensibilité aux oxydants les rend instables en milieu alcalin. Leur structure de base est le système tricyclique 3,4- propinoperhydropurine (Figure 2). La saxitoxine et ses dérivés peuvent être divisés en quatre groupes (Frémy and Lassus, 2001) :

- les carbamates qui incluent la saxitoxine (STX), les gonyautoxines (GTX2, GTX3, GTX1, et GTX-4) et la néo-saxitoxine (NéoSTX)
- les N-sulfocarbamoyles qui incluent les toxines B ou GTX selon que l'on suit les terminologies japonaises ou nord-américaines (B1 ou GTX5, B2 ou GTX6) et les toxines C (C1, C2, C3, C4)
- les décarbamoyles (dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, dcGTX1, dcGTX6 et dcNEO)
- les deoxydecarbamoyles (doSTX, doGTX2 et doGTX3) avec un atome d'hydrogène en position R4.

Les différentes variantes proviennent essentiellement des biotransformations dues à l'épimérisation, l'hydrolyse et la réduction (Oshima, 1995).



Toxine	R1	R2	R3	R4	Poids moléculaire [g/mol]
STX	H	H	H		301
NEO	OH	H	H		317
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	H ₂ N-COO	412
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	(Carbamoyle-)	396
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H		396
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H		412
B1	H	H	H		380
B2	OH	H	H		396
C3	OH	H	OSO ₃ ⁻	O ₃ S-NH-COO	492
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	(N-Sulfocarbamoyle-)	476
C2	H	OSO ₃ ⁻	H		476
C4	OH	OSO ₃ ⁻	H		492
dcSTX	H	H	H		258
dcNEO	OH	H	H		274
dcGTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	OH	369
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	(Décarbamoyle-)	353
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H		353
dcGTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H		369
doSTX	H	H	H	H	242
doGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	(Déoxydécarbamoyle-)	337
doGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H		337

Figure 2. La structure chimique de la saxitoxine et de ses dérivés.
D'après (Frémy and Lassus, 2001), adapté.

c) La toxicologie : Effet chez l'homme et mode d'action

Les toxines paralysantes sont les neurotoxines les plus connues dont le dérivé le plus toxique chez l'homme est la saxitoxine. La dose létale par voie orale est comprise entre 1 et 4 mg équivalent STX, en fonction du sexe et de l'état physiologique de chacun. Une fois ingérées, elles sont rapidement absorbées par le tractus gastro-intestinal et excrétées dans l'urine. Les premiers signes cliniques apparaissent dans les 30 à 60 minutes après ingestion et sont d'abord de nature gastro-intestinale, puis d'ordre neurologique. Trois degrés d'intoxication ont été établis en fonction de la gravité des symptômes observés (Frémy and Lassus, 2001). Le niveau bénin correspond à une paresthésie buccale, pouvant s'étendre au visage et au cou, puis aux extrémités des doigts et aux orteils. Dans certains cas, des nausées et des vomissements sont observés. Le niveau sévère se caractérise par des paresthésies de bras et de jambes, une incohérence de la parole, des sensations d'engourdissement et d'ataxie ainsi que par l'apparition de difficultés respiratoires et de sensations d'étouffement. Le niveau extrême présente une variété de symptômes neurologiques aboutissant à des sensations de choc, des paralysies motrices et en particulier respiratoires pouvant conduire à la mort en l'absence d'assistance respiratoire. Des chocs cardiovasculaires peuvent également avoir lieu (Prakash et al., 1971).

La distribution et la fréquence des intoxications par les toxines paralysantes continuent à augmenter globalement avec 2000 cas d'intoxications recensés par an à l'échelle mondiale, et dont le taux de mortalité est de 15% (Kellmann et al., 2008). Bien que sa détection initiale date de 1957, aucun antidote de la saxitoxine n'est disponible à ce jour. Seuls des systèmes d'aide à la respiration ainsi que des techniques pour limiter l'assimilation des toxines sont mis en place, tels que la vidange du contenu gastrique, l'inactivation des phycotoxines par du charbon actif ou des boissons alcalines, et l'administration de diurétiques.

Comment alors la saxitoxine agit-elle ?

La saxitoxine est un inhibiteur neurotoxique qui se fixe sur les canaux sodiques voltage-dépendants situés sur les membranes des cellules excitatrices en supprimant activement l'excitation des impulsions neuronales (Figure 3). Avec une forte affinité ($K_d \sim 2 \text{ nM}$) pour la liaison sur le site 1 du canal d'ions sodium voltage-dépendant, la STX inhibe la perméabilité temporaire des ions sodium en se liant étroitement à un site de récepteur de surface cellulaire. La génération de l'impulsion dans les nerfs périphériques et les muscles squelettiques est ainsi inhibée (Narahashi, 1972, Kao, 1972). La saxitoxine peut également affecter directement le

muscle squelettique en bloquant le potentiel d'action musculaire sans dépolarisation des cellules ce qui abolit la conduction nerveuse périphérique (Befort et al., 2003).

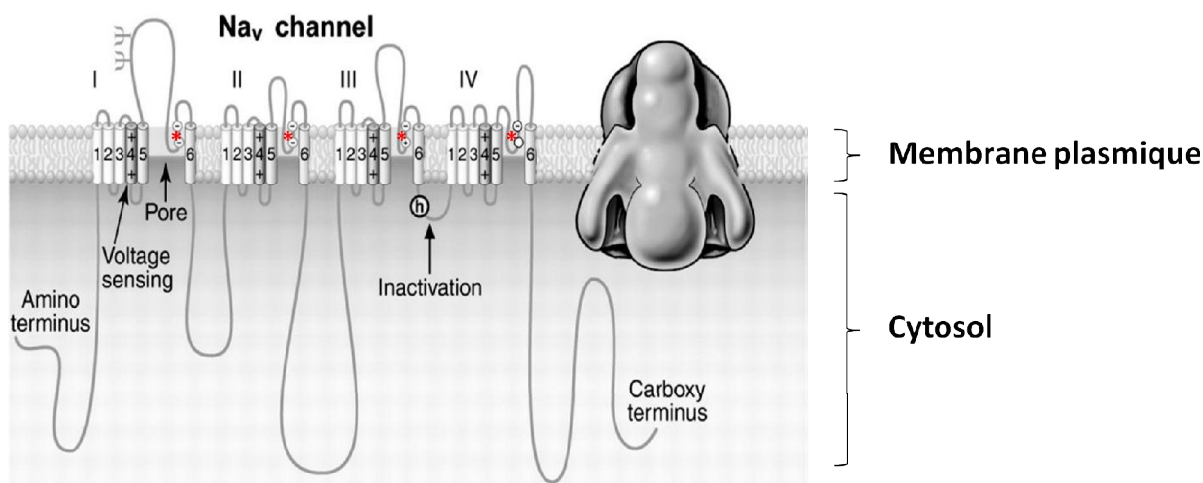


Figure 3. Le canal sodium voltage-dépendant.

La sous-unité α du canal sodium voltage-dépendant est composée de quatre domaines homologues (I-IV) qui contiennent tous six segments transmembranaires (1-6). Les quatre domaines sont reliés par trois boucles de liaison cytoplasmique de taille différente. Chaque domaine consiste en deux modules, le premier étant le module de détection de tension formé par les segments 1 à 4, le second étant le module de formation de pores formé par les segments 5 et 6 et la boucle de connexion. La partie du canal responsable de l'inactivation rapide après l'ouverture du canal est hautement conservée et relie les domaines III et IV. La saxitoxine se lie étroitement au site 1 du canal (étoile rouge), bloque le pore et inhibe ainsi la perméabilité temporaire des ions sodium. D'après (Yu et al., 2005), adapté.

d) Les efflorescences de microalgues productrices de toxines paralysantes en Europe

Des efflorescences étendues de microalgues productrices de toxines paralysantes ont été mises en évidence en Irlande (Stobo et al., 2008), en Norvège (Sayfritz et al., 2008) en Espagne (Blanco et al., 2006), au Portugal (Artigas et al., 2007), en Ecosse (Collins et al., 2009) et en Grèce (Ignatiades et al., 2007).

En France, la première détection des toxines paralysantes date de 1988 dans les Abers (Bretagne nord), la microalgue identifiée comme responsable étant *Alexandrium minutum* (Masselin et al., 2000). En méditerranée, ces toxines ont été détectées pour la première fois en 1998 dans la lagune de Thau, *Alexandrium catenella* étant l'espèce de dinoflagellé responsable

(Lilly et al., 2002). La rade de Toulon en 2000, le bassin d'Arcachon (Banc d'Arguin) en 2002 et la rade de Brest ont connu ensuite le développement d'espèces d'*Alexandrium* productrices de toxines paralysantes.

I.3 Les efflorescences toxiques récurrentes d'*Alexandrium catenella* dans la lagune de Thau

I.3.1 La lagune de Thau

La lagune de Thau est la plus grande et la plus profonde lagune de la région Languedoc-Roussillon avec une superficie d'environ 75 km² et une profondeur moyenne de 5 m. Ces caractéristiques la distinguent des lagunes de la région et s'expliquent par sa formation d'origine tectonique : cette lagune est le synclinal d'un plissement dont l'anticlinal est la montagne de la Gardiole au nord-est.

La lagune de Thau est en communication directe avec la mer par deux graus (le grau de Pisses-Saumes au sud et le canal de Sète à l'est) et par deux canaux de navigation (le canal du Midi au sud et le canal du Rhône à l'est). Une dizaine de petits cours d'eau alimentent également cette lagune, dont les deux majeurs sont la Vène et le Pallas (Figure 4). Les débits de ce réseau hydrographique sont régis par le climat méditerranéen littoral caractérisé par des précipitations irrégulières et souvent automnales. Les débits moyens mesurés sont donc faibles et des crues soudaines et fortes peuvent être générées pendant la saison automnale. Ces caractéristiques hydro-morphologiques mènent à un faible taux de renouvellement des eaux lagunaires qui sont, de ce fait, particulièrement sensibles aux conditions d'apports en particulier provenant des cours d'eau. Elles permettent également de maintenir une salinité élevée dans la lagune (proche de celle de la mer méditerranée ~ 37 ‰) rendant possible la mise en place d'une activité conchylicole.

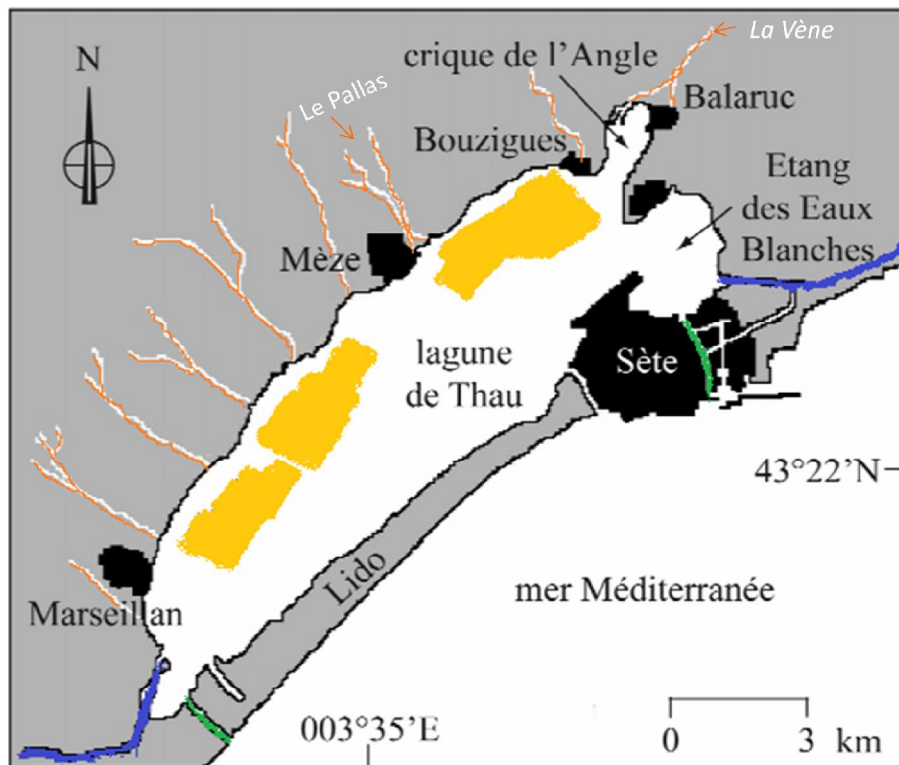


Figure 4. La lagune de Thau avec les tables conchylicoles.

La lagune de Thau est en communication avec la mer Méditerranée grâce à deux canaux (bleu) et deux graus (vert) et est alimentée par de petits cours d'eau (orange) dont les deux majeurs sont la Vène et le Pallas. Les tables conchylicoles sont organisées en trois secteurs (jaune).

Les conditions environnementales de la lagune se caractérisent par une augmentation globale des températures au cours de ces dernières décennies ($0,045^{\circ}\text{C}/\text{an}$), principalement marquée au printemps (Collos et al., 2009). Ceci peut être attribué aux activités humaines à travers le réchauffement global. Une diminution marquée des concentrations en phosphate est également observée depuis le début des années 90 avec des concentrations inférieures à $1\ \mu\text{M}$ en été et indétectables en hiver ($<0,03\ \mu\text{M}$) (Souchu et al., 1998). Cette forte baisse des concentrations du phosphate peut être expliquée par la mise en place de nombreuses infrastructures de traitements des eaux usées depuis une trentaine d'années. Thau est ainsi devenu l'une des lagunes les moins eutrophes de la côte méditerranéenne.

1.3.2 L'Apparition d'*Alexandrium catenella* dans la lagune de Thau dans les années 90

Chaque espèce phytoplanctonique étant caractérisée par une gamme de tolérance par rapport aux facteurs physiques tels que la température et la lumière, les efflorescences phytoplanctoniques sont des phénomènes saisonniers. Dans la lagune de Thau, *Alexandrium catenella* provoque des efflorescences toxiques automnale et printanière. Le déterminisme de ces efflorescences a été largement étudié (Collos et al., 2004, Collos et al., 2007, Collos et al., 2009, Laabir et al., 2011, Laabir et al., 2013, Laanaia et al., 2013, Genovesi et al., 2015).

a) Morphologie d'*Alexandrium catenella*

Alexandrium catenella est un dinoflagellé planctonique eucaryote unicellulaire, de forme arrondie, présent dans les écosystèmes marins (Figure 5A).

La cellule d'*A. catenella* est divisée en deux parties, l'épithèque et l'hypothèque, séparées par le sillon équatorial appelé cingulum. Antapex et apex désignent les deux extrémités antérieure et postérieure de la cellule, respectivement. La cellule possède deux flagelles dissemblables. L'un en forme de ruban, situé dans une rainure transversale (cingulum), permet de faire tourner la cellule sur elle-même et contribue à la propulsion vers l'avant ; l'autre plus conventionnel, dirigé postérieurement et émergeant d'un sillon ventral (sulcus), bat à l'arrière de la cellule et exerce l'essentiel de l'effort de propulsion (Fensome et al., 1998). La cellule d'un dinoflagellé est entourée par une membrane extérieure continue dans laquelle se trouvent les vésicules amphiesmales et est aussi recouverte de plusieurs plaques cellulodiques formant une thèque plus ou moins épaisse. Son noyau, appelé dinocaryon, est très caractéristique, car les chromosomes qu'il contient sont généralement nombreux et condensés et présentent une mitose particulière, sans fuseau ni centromère (Figure 5D).

A. catenella se différencie d'*Alexandrium tamarense* par sa capacité à former des chaînes de plus de 2 cellules en phase exponentielle de croissance ainsi que par l'absence du pore ventral entre les plaques 1 et 4 au niveau de l'épithèque (Figure 5B).

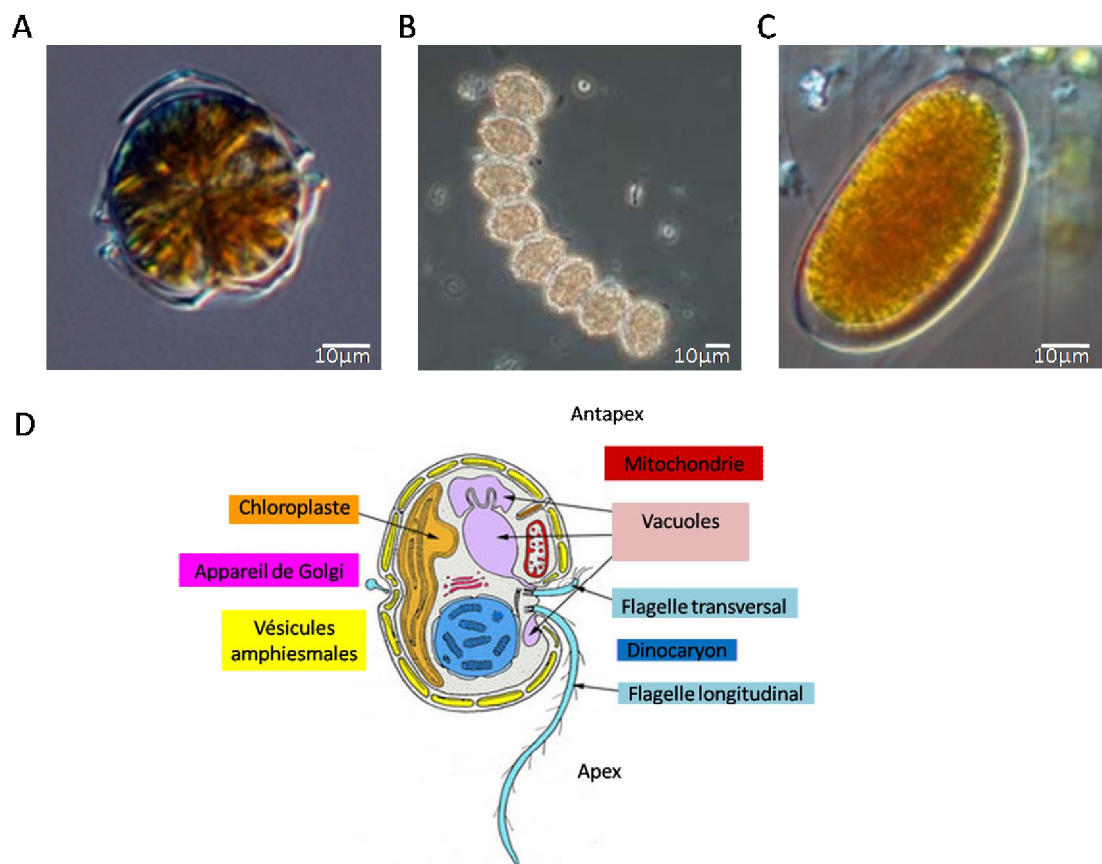


Figure 5. L'algue productrice de toxines paralysante *Alexandrium catenella*.

A, B et C : Illustration microscopique des différents stades de vie d'*Alexandrium catenella*. Cellule végétative d'*A. catenella* (A, d'après « The Phytoplankton Encyclopaedia Project, University of British Columbia », 2012), chaîne de 8 cellules et kyste de résistance d'*A. catenella* (B et C respectivement, d'après « World Register of Marine Species », 2010). D : La morphologie d'un dinoflagellé à thèque. D'après (Taylor, 1980), adapté.

b) Cycle de vie d'*Alexandrium catenella*

Le cycle de vie d'*Alexandrium catenella* repose sur une alternance entre des stades benthiques et pélagiques mais aussi entre des phases sexuées et asexuées.

En effet, *A. catenella* est une espèce pouvant être présente dans le milieu au niveau du sédiment sous forme de cellules immobiles appelées kystes dormants ou de résistance, on parle alors d'un stade benthique (Figure 5C). Le métabolisme ralenti de ces cellules permet à l'espèce de survivre à des conditions environnementales défavorables. Ces kystes peuvent rester dormants pendant de nombreuses années dans le sédiment et l'ADN qu'ils contiennent est naturellement protégé par les structures extérieures qui les entourent (Anderson et al., 2012).

A. catenella peut également être présente au niveau de la colonne d'eau sous forme de cellules mobiles flagellées nommées cellules végétatives, on parle alors d'un stade pélagique (Figure 5A et B). En fait, lorsque les conditions de croissance sont favorables, les kystes peuvent germer et inoculer la colonne d'eau sous forme de cellules végétatives et ainsi former des efflorescences (Anderson et al., 2012).

Le cycle de vie de cette algue est illustré dans la figure ci-dessous (Figure 6).

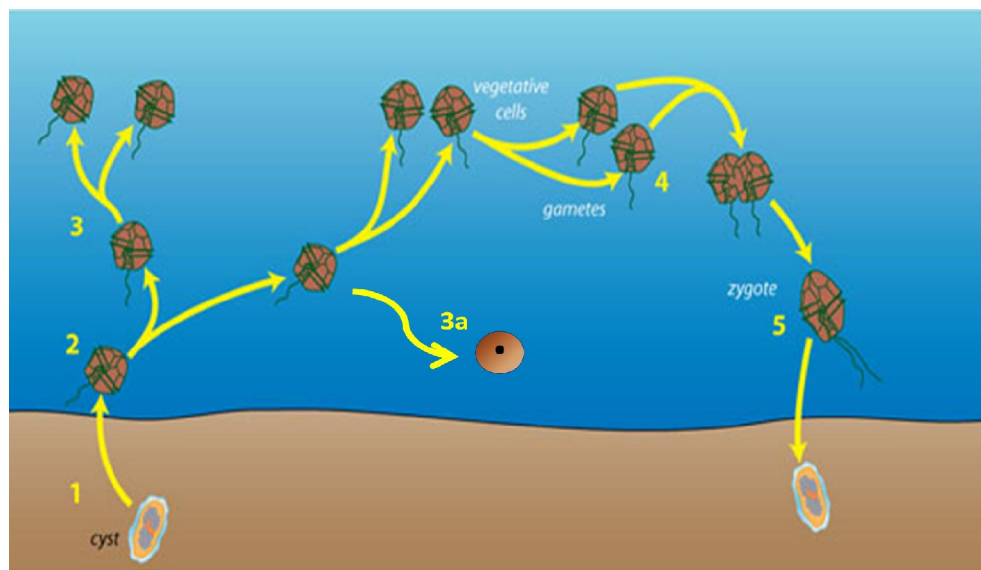


Figure 6. Le cycle de vie d'*Alexandrium catenella*

La germination d'un kyste dormant diploïde dans le sédiment (1) permet la libération dans la colonne d'eau d'un planométiocyte (2) qui, à l'issue d'une méiose, donne deux cellules végétatives haploïdes. La division de ces dernières par simple fission binaire donne deux cellules filles identiques à la cellule mère menant ainsi à une efflorescence (3), c'est la reproduction asexuée. En cas de stress, les cellules peuvent former des kystes temporaires (3a) (Fistarol et al., 2004a). Ces kystes à membrane fine peuvent survivre pendant un temps limité. Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables à la croissance de l'espèce, les cellules végétatives produisent des gamètes (4) qui fusionnent pour former un planozygote diploïde (5). C'est la reproduction sexuée qui peut avoir lieu soit à partir de la rencontre de types sexuels différents (cycle hétérothallique) soit d'un même type sexué (cycle homothallique). Cette cellule évolue en se chargeant de réserves et en perdant sa mobilité afin de mener à la formation d'un kyste dormant immature. Ce kyste benthique subit, dans le sédiment, une période de dormance obligatoire associée à une phase de maturation avant de pouvoir germer. Les kystes de résistance restent en état de dormance tant que les conditions environnementales, entre autres de température et de lumière, sont défavorables au développement d'une efflorescence. D'après (Anderson et al., 2012), adapté.

c) *Alexandrium catenella*, des efflorescences récurrentes

Depuis 1987, un suivi régulier de la communauté phytoplanctonique dans la lagune de Thau a été mis en place par l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer), la surveillance des phycotoxines étant imposée par la réglementation européenne, prenant en compte l'évolution des connaissances sur ces toxines et leur présence dans les eaux européennes et dans les produits d'importation. Un événement non-toxique d'*Alexandrium* a été observé en 1995 mais le premier bloom toxique de cette espèce ne fut détecté qu'en 1998 (Lilly et al., 2002). Depuis, la lagune de Thau est confrontée régulièrement à des efflorescences toxiques récurrentes saisonnières d'*Alexandrium catenella* qui ont lieu au printemps et à l'automne (Laanaia et al., 2013). Et c'est en automne 2004 que le bloom le plus important fut observé avec une concentration algale de 15×10^6 cellules/L d'eau de mer.

L'avènement d'une efflorescence dans un milieu aquatique est la résultante (i) d'une croissance cellulaire suffisante de l'espèce pour compenser les pertes de biomasse dues au broutage, à l'advection ou à la lyse parasitaire (Smayda, 1997), (ii) d'une adaptation de la population aux conditions physicochimiques (température, intensité lumineuse, disponibilité en sels nutritifs) et biologique (compétition interspécifique) du milieu qui eux régulent les caractéristiques métaboliques de la cellule et (iii) d'une capacité compétitrice de cette espèce par rapport aux autres espèces phytoplanctoniques dans ces conditions environnementales.

L'initiation des blooms d'*A. catenella* en particulier nécessite des températures stables aux alentours de 20°C pendant plusieurs jours et des concentrations en nutriments inorganiques et organiques suffisants (Collos et al., 2009, Collos et al., 2004, Laanaia et al., 2013). Les efflorescences de cette algue sont observées de manière récurrente depuis 1998. En effet, la capacité d'*A. catenella* à rentrer dans une phase de dormance sous forme de kystes benthiques lui permet de résister à des conditions défavorables et à ensemercer la colonne d'eau au moment d'une fenêtre environnementale favorable à la germination des kystes et la croissance des cellules végétatives (Genovesi et al., 2011). L'excrétion de molécules toxiques ou allélopathiques (Arzul et al., 1999), c'est-à-dire la libération de métabolites secondaires dans l'environnement par un organisme et ayant un effet sur un autre, joue aussi un rôle primordial dans la limitation du broutage et l'inhibition de la croissance de certaines espèces algales compétitrices. De plus, les capacités de migration des cellules végétatives permettent aux cellules d'optimiser leurs conditions de lumière ou de disponibilité en nutriments en fonction de leurs

besoins (Sullivan et al., 2003). En outre, *A. catenella* est une espèce mixotrophe : elle est capable d'utiliser de l'azote organique (Collos et al., 2004, Collos et al., 2007) et de phagocyter les cyanobactéries (Jeong et al., 2005).

L'existence d'une zone préférentielle d'initiation des blooms à l'échelle de la lagune de Thau illustre l'importance majeure des stratégies d'acquisition des nutriments par *A. catenella* dans la compétitivité de cette espèce. Malgré la répartition des zones d'accumulation de kystes au niveau des sédiments dans plusieurs zones de la lagune, les efflorescences semblent systématiquement s'initier au niveau de la Crique de l'Angle. Située à l'embouchure de la Vène, cette dernière est une zone d'apports importants d'éléments nutritifs à l'échelle de l'étang grâce au débit de la Vène, aux rejets associés à une station de lagunage située en bordure de la Crique et à l'activité thermique de la ville de Balaruc-les-Bains. En fonction des conditions de vents et de courants associés, cette zone peut également favoriser l'amplification d'une efflorescence en maintenant les cellules dans des conditions favorables et stables ou les disperser vers le reste de la lagune et augmenter ainsi le risque de contamination des parcs conchylicoles (Laanaia et al., 2013).

I.3.3 Impact des microalgues toxiques sur la production conchylicole

Le bassin de Thau constitue la plus importante zone conchylicole de la méditerranée avec une production d'environ 13000 tonnes d'huîtres (*Crassostrea gigas*) et 3000 tonnes de moules (*Mytilus galloprovincialis*) par an, soit 90 % de la production conchylicole méditerranéenne française. Cette activité s'étend sur une superficie de 1300 ha et est organisée en trois secteurs (Figure 4). Elle représente 10% de la production nationale et atteint un chiffre d'affaire annuel de 35 millions d'euros. Cette activité génère 2000 emplois directs dont 800 sont des producteurs (D'après le Syndicat Mixte du Bassin de Thau, SMBT).

La filière conchylicole représente ainsi un poids économique de premier plan pour le territoire. Les huîtres *C. gigas*, comme d'autres mollusques bivalves, sont des filtreurs qui se nourrissent de micro-phytoplancton, y compris les dinoflagellés toxiques. Les développements récurrents d'efflorescences toxiques d'*A. catenella*, observés dans l'étang de Thau depuis la fin des années 90 (Lilly et al., 2002), peuvent donc fortement perturber la production de ce secteur,

en plus de provoquer des risques majeurs d'intoxication alimentaire et par conséquent un retard voire parfois une interdiction de la commercialisation des huîtres.

En effet, les efflorescences d'algues toxiques sont fortement corrélées à de pertes économiques dans le secteur ostréicole. Cependant un nombre limité d'études s'est à ce jour penché sur l'impact économique et sociétal des interdictions de ventes dues aux microalgues toxiques sur la production des mollusques (Hoagland and Scatasta, 2006, Groeneveld et al., 2016, Sanseverino et al., 2016). Ces études ont principalement répertorié l'impact économique des HABs aux Etats-Unis et seulement dans quelques pays européens. A titre d'exemple, au Texas, principale région de production d'huître aux Etats-Unis, divers blooms d'algues en 2011 ont causé la fermeture de plusieurs zones conchylicoles. L'évaluation de la perte économique conséquente sur deux sites, « Calhoun Country » et la baie de Galveston, calculée sur une période de 3 à 4 mois, étaient de 22 mille et 167 mille dollars, respectivement (Sanseverino et al., 2016). En France, et plus particulièrement dans la lagune de Thau, la fermeture des fermes conchylicoles due à la prolifération de microalgues toxiques a également été signalée causant ainsi des pertes dans l'industrie ostréicole. Cependant, des estimations fiables de ces effets économiques restent manquantes.

II. L'HUITRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS*

L'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* est un mollusque bivalve appartenant à la famille des *Ostreidae* (Lophotrochozoa, Mollusca, Bivalvia). Originaires du Pacifique nord-ouest, *C. gigas* a été introduite le long des côtes européennes dans les années 1970 pour restaurer l'ostréiculture à la suite d'une épidémie due à un Iridovirus qui a décimé l'huître creuse portugaise *Crassostrea angulata* qui était cultivée jusque là sur les côtes françaises (Comps and Duthoit, 1979). Aujourd'hui, *C. gigas* se retrouve dans les écosystèmes côtiers ouverts, les rivages rocheux et les marais vaseux avec une distribution mondiale qui s'étend du Japon à l'Europe et l'Amérique.

II.1 La physiologie de l'huître

Les huîtres sont composées d'un corps mou comprimé latéralement et enfermé dans une coquille calcaire. La coquille est composée de deux valves articulées par un ligament charnière et reliées par un muscle adducteur. Les valves sont asymétriques et produites par le manteau, un organe recouvrant le corps interne de l'huître (Figure 7). Le manteau possède également une fonction sensorielle et peut induire la fermeture des valves en réponse à des changements environnementaux. Les bivalves étant acéphales, leur système nerveux se limite à deux paires de cellules nerveuses reliées entre elles ; une près de la bouche, l'autre sous le muscle adducteur (Kennedy et al., 1996).

Les huîtres possèdent deux paires de branchies localisées de chaque côté de leur corps. Elles permettent d'assurer la capture et le transport de la nourriture, ainsi que la fonction respiratoire (Le Moullac et al., 2009). Les palpes labiaux sont situés dans la région antéro-ventrale du corps, autour de la bouche afin que la nourriture soit directement ingérée. Le système digestif commence au niveau de la bouche, une fente en U inversée où commence directement l'œsophage dorsoventral qui relie la bouche à l'estomac. Ce dernier est entouré par la glande digestive et contient un stylet cristallin assurant le broyage des aliments ingérés. L'intestin est relié au rectum qui se finit au niveau de l'anus.

A l'inverse des autres espèces de bivalves, les huîtres sont des organismes hermaphrodites successifs. La gonade est localisée au niveau de la masse viscérale entre la glande digestive et le

manteau. Elle s'étend de l'œsophage à la cavité péricardique, formant deux lobes qui entourent la glande digestive (Kennedy et al., 1996).

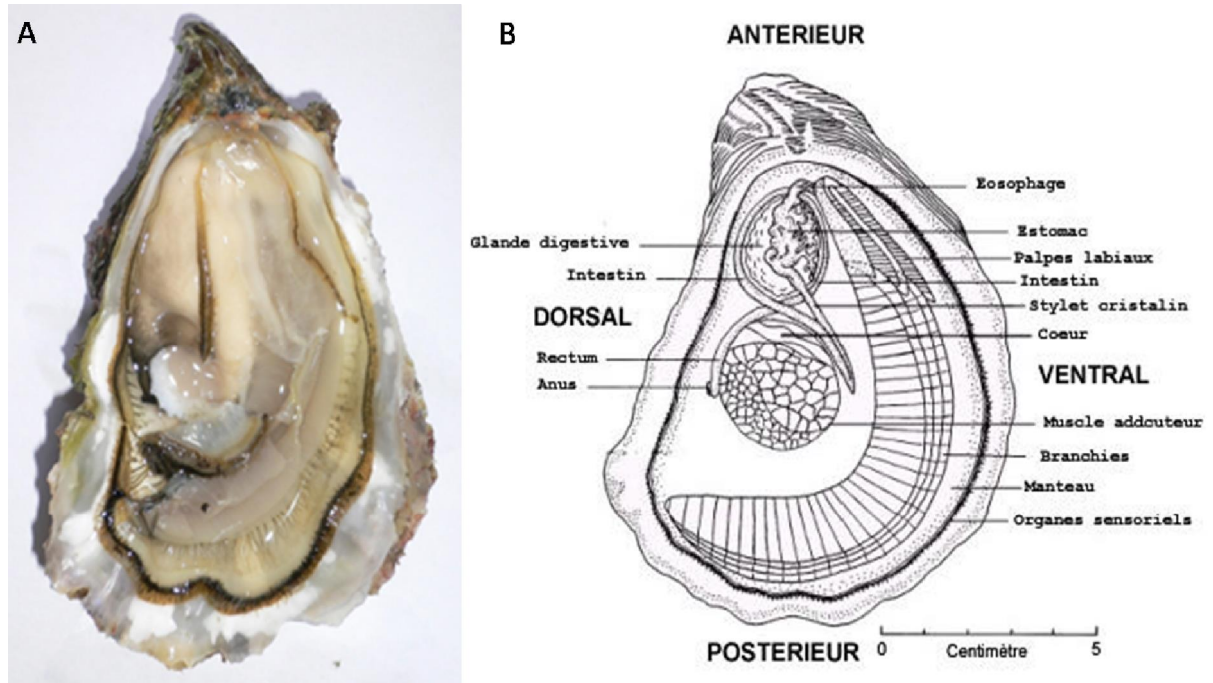


Figure 7. L'huître creuse *Crassostrea gigas*.

A : Photo de l'intérieur de la valve gauche de *C. gigas*.

B : Anatomie de *C. gigas*. Schéma de la vue intérieure de la valve gauche d'une huître adulte. D'après (Kennedy et al., 1996).

II.2 Le processus digestif de l'huître

Les huîtres sont des animaux benthiques suspensivores qui se nourrissent par filtration à partir de cellules phytoplanctoniques, de ciliés et de débris de macro-algues (Le Gall et al., 1997, Levinton et al., 2002). Leur processus alimentaire se décompose en différentes étapes comme l'interception des particules, leur transport, leur sélection et leur ingestion (Beninger et al., 1995).

La consommation de particules est déterminée par la filtration et par l'efficacité de rétention (Palmer and Williams, 1980). Le taux de filtration correspond au volume traversant les branchies par unité de temps (Hawkins et al., 1998) et dépend du poids sec de l'animal et des conditions environnementales qui l'entourent, tel que la température, la salinité et la quantité et la qualité des matières en suspension (Barille et al., 1997). Dans le cas de présence de phycotoxines, la

nature et la concentration de la toxine influencent également le taux de filtration des huîtres (Bricelj and Shumway, 1998a). La quantité de particules retenues sur les branchies par unité de temps correspond à la consommation (Hawkins et al., 1998).

L'huître a une capacité d'améliorer la qualité de la prise de nourriture et de détecter la présence ou non de micro-algues toxiques grâce à une sélection pré-ingestive des particules permettant de rejeter celles indésirables sous forme de pseudo-fèces. Cette sélection s'effectue essentiellement en fonction de la taille, de la qualité et de la composition biochimique des particules alimentaires (Levinton et al., 2002). Une première sélection basée sur la taille des particules s'effectue au niveau des branchies. Les particules de petites tailles (3 à 20 μ m en moyenne) sont acceptées et sont dirigées vers la partie dorsale de la branchie alors que les particules initialement trop grosses (>70 μ m) sont rejetées ventralement (Beninger et al., 2005). Les palpes labiaux assurent ensuite l'acheminement des particules sélectionnées pour l'ingestion vers la bouche et le rejet des particules grosses sous forme de pseudo-fèces. Une seconde sélection basée sur la qualité et la quantité des particules s'effectue au niveau des palpes labiaux. Les particules de faible niveau nutritionnel sont ainsi préférentiellement rejetées sous forme de pseudo-fèces et les quantités ingérées régulées une fois le système digestif rempli (Deslous-Paoli et al., 1992). L'efficacité de sélection est corrélée avec la taille des palpes labiaux (Barillé et al., 2000).

II.3 Le système immunitaire de l'huître

Chez les huîtres, le système circulatoire est composé du cœur (comportant deux paires d'oreillettes et un ventricule), d'artères et de veines. C'est un système semi-ouvert dans lequel circule un sang incolore dépourvu de pigments, l'hémolymph, composé d'une partie acellulaire, appelée plasma, et de cellules circulantes nommées hémocytes. L'hémolymph assure la distribution de nutriments, l'évacuation des déchets métaboliques, la défense contre les infections mais aussi le transport d'oxygène sous forme dissoute (Bachere et al., 2004). Le système circulatoire étant semi-ouvert, l'hémolymph est non seulement en contact direct avec le milieu extérieur mais aussi avec les tissus de l'huître, permettant ainsi aux hémocytes de s'infiltrer dans les tissus par diapédèse (Galtsoff, 1964, Cheng, 1996, Schmitt et al., 2012b).

II.3.1 Les cellules immunitaires

Les hémocytes sont les cellules immunocompétentes de l'huître. Ils jouent un rôle fondamental dans la réparation de lésions, le transport et la digestion de nutriments, et dans la réponse immunitaire (Sminia and van der Knaap, 1987, Cheng, 1996, Schmitt et al., 2012b). Ils ont également une capacité de reconnaissance du non-soi et des capacités de chimiotactisme, de phagocytose et de sécrétion d'agents microbicides (enzymes hydrolytiques, espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), protéines/peptides antimicrobiens). Certaines populations d'hémocytes sont considérées comme des « phagocytes professionnels », pouvant migrer par chimiotactisme vers les tissus en cas de blessure ou d'infection pour phagocyter des agents microbiens.

La classification des hémocytes de l'huître a fait l'objet de nombreuses études basées essentiellement sur des critères morphologiques et ultrastructuraux, des signatures physico-chimiques et des fonctions biologiques. Ainsi, les hémocytes ont été classés en deux catégories : les cellules granuleuses et les agranuleuses (Cheng, 1981, Bachere et al., 1988, Ashton-Alcox and Ford, 1998, Hine, 1999, Aladaileh et al., 2007). Les cellules granuleuses se divisent en des granulocytes basophiles avec des granules clairs et des granulocytes éosinophiles avec des granules denses aux électrons (Hine, 1999, Bachere et al., 2004). Les cellules agranuleuses comprennent trois groupes : les « blast-like », les « macrophage-like » et les hyalinocytes, distingués sur la base de leur rapport nucléoplasmique et de la présence ou l'absence de quelques granules cytoplasmiques (Hine, 1999, Bachere et al., 2004). En 2004, Bachère et al. ont émis l'hypothèse que ces cellules non granuleuses correspondaient à la même lignée cellulaire observée à différentes phases de maturation et d'activité. De même, les granulocytes éosinophiles pourraient être le résultat de la maturation des granulocytes basophiles (Bachere et al., 2004).

Les sites d'hématopoïèse restent inconnus. Toutefois, des travaux récents ont montré la présence d'une population de cellules précurseurs présente à la base des branchies, grâce à des marqueurs cellulaires spécifiques de cellules précurseurs (Sox20). Il a été suggéré que ces cellules se différencieraient ensuite en hémocytes dans les branchies (Jemaa et al., 2014).

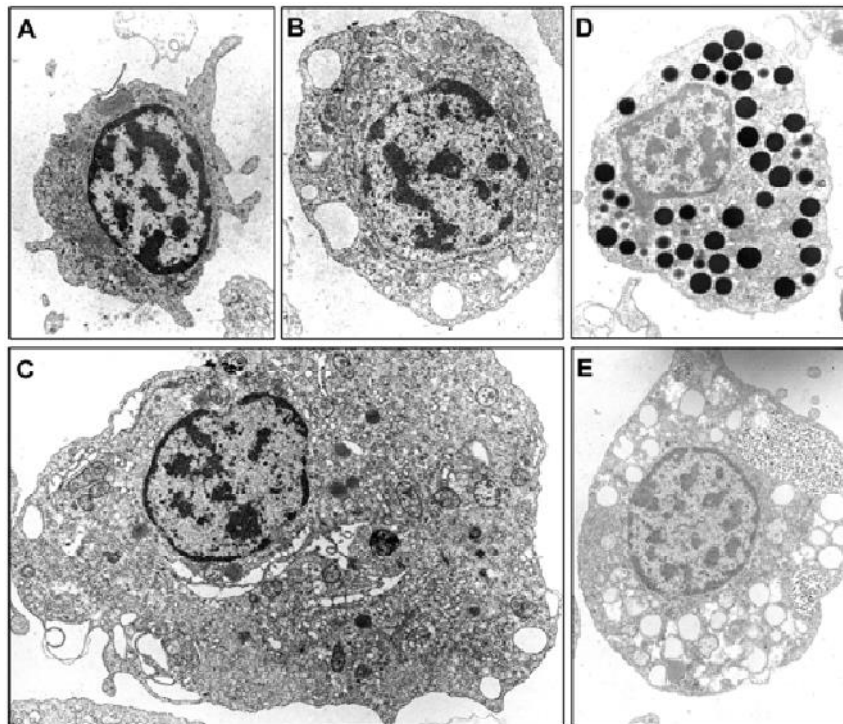


Figure 8. Les hémocytes de l'huître *Crassostrea gigas*.

Les hémocytes ont été classés en 2 populations : cellules agranuleuses (A, B et C) et granulocytes (D et E). Les cellules agranuleuses ont été divisées en 3 groupes : les cellules « blast-like » (A), les cellules « macrophages-like » (B) et les hyalinocytes (C). Les granulocytes ont été divisés en 2 groupes en fonction du contenu des granules, soit denses aux électrons (D) soit clairs aux électrons (E). Microscopie électronique à transmission x15000. D'après Bachere et al. 2004.

II.3.2 Les composants plasma-solubles

A ce jour, aucune protéine respiratoire plasmatique n'a été mise en évidence chez les huîtres ; l'oxygène serait dissous et transporté par l'hémolymph. La protéine majoritaire du plasma qui a été caractérisée chez *C. gigas*, est une superoxyde dismutase extracellulaire à cuivre/zinc (Cg-EcSOD, nommée aussi cavortine) présentant des séquences homologues avec les superoxyde dismutase extracellulaires (EcSODs) (Gonzalez et al., 2005, Scotti et al., 2007, Green et al., 2009, Itoh et al., 2011). Les superoxyde dismutase sont des métallo-enzymes qui catalysent la dismutation du superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène. Par conséquent, elles ont un rôle antioxydant important dans les cellules exposées à l'oxygène et représentent une protection contre les ROS qui peuvent être nocifs pour les tissus à des concentrations élevées. Chez *C.*

gigas, Cg-EcSOD peut se lier aux hémocytes via les α -intégrines et agir en tant qu'opsonine avec les vibrios pathogènes (Duperthuy et al., 2011). Une étude récente a permis de montrer que cette protéine majoritaire du plasma de *C. gigas* présentait aussi des activités antivirales (Green et al., 2014b).

II.3.3 Les réactions immunitaires de l'huître

Les huîtres, comme tous les invertébrés, possèdent un système de défense basé sur l'immunité innée. La première ligne de défense est assurée par la coquille, une barrière physique qui protège contre la prédation et les blessures et empêche les dommages des tissus sous-jacents. Les surfaces épithéliales, telles que le manteau et les branchies, et le mucus, recouvrent entièrement le corps de l'huître et font également partie de la première ligne de défense contre les infections. Ensuite, diverses réactions cellulaires et effecteurs moléculaires produits essentiellement par les hémocytes et les tissus se mettent en place dès la pénétration d'un pathogène dans l'organisme. Les défenses immunitaires de l'huître se résument ainsi à trois mécanismes principaux : la reconnaissance des microorganismes par des composés solubles ou des récepteurs/protéines cellulaires, la signalisation et l'activation des hémocytes, et les réactions de défense cellulaire et la production d'effecteurs moléculaires impliqués dans la défense de l'hôte (Schmitt et al., 2012b).

II.3.3.1 Les mécanismes de la reconnaissance du non-soi

La reconnaissance du non-soi est essentielle pour le déclenchement des différentes réponses immunitaires innées suite à l'exposition aux micro-organismes. Chez l'huître, la reconnaissance du non-soi se fait par une liaison spécifique des protéines solubles de l'hôte (PRPs - pattern recognition proteins), ou des récepteurs associés aux membranes cellulaires (PRRs - pattern recognition receptors) aux motifs moléculaires associés aux pathogènes appelés PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) (Medzhitov and Janeway, 2002). Les PAMPs les plus connus sont le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif, le peptidoglycane (PG) des bactéries à Gram positif et négatif, les acides lipotéichoïques (LTA) des bactéries à Gram

positif, les α -1,3-glucanes des champignons et les ARN double brin des virus répliatifs (Mogensen, 2009). Cependant ces molécules ne sont pas spécifiques des pathogènes et sont partagées par différents organismes incluant des bactéries symbiotiques ou mutualistes (Nyholm and Graf, 2012). Ainsi, le terme plus général de motifs de reconnaissance présents à la surface des micro-organismes MAMPs (microbial-associated molecular patterns) a été introduit en 2004 (Koropatnick et al., 2004).

Le système immunitaire de l'huître répond également à des signaux intracellulaires qui sont déclenchés par des molécules endogènes sécrétées par des tissus endommagés, les DAMPs (damage-associated molecular patterns) (Matzinger, 2002, Rubartelli and Lotze, 2007). Les DAMPs de nature protéique incluent les protéines de chocs thermiques (HSP), les « High mobility group box 1 (HMGB1) » et des protéines qui dérivent de la matrice extracellulaire. Les DAMPs de nature non protéique incluent l'ATP, l'acide urique, le sulfate d'héparine et l'ADN (Matzinger, 2002).

Chez *C. gigas*, une DAMP, la *Cg*-HMGB1, a été identifiée et caractérisée en 2013 (Li et al., 2013). De même, plusieurs PRRs et PRPs ont également été identifiés et caractérisés chez *C. gigas*, comme les protéines de reconnaissance du peptidoglycane (PGRP) (Itoh and Takahashi, 2008, Itoh and Takahashi, 2009, Zhang et al., 2013), des protéines de liaison aux α -1,3-glucanes (α -GBP) des champignons (Tanguy et al., 2004, Itoh and Takahashi, 2009), et des lectines (gigalines, ficolines, galectines, lectines de type C et *Cg*-Siglec-1) (Olafsen et al., 1992, Gueguen et al., 2003, Yamaura et al., 2008, Roberts et al., 2009, de Lorgeril et al., 2011, Liu et al., 2016a). Gonzalez et al. ont identifiés deux PRRs ayant des propriétés de liaison au LPS : ce sont la protéine antimicrobienne *Cg*-BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) et la protéine majoritaire du plasma, la *Cg*-EcSOD, qui sont surexprimées suite à une stimulation par le LPS (Gonzalez et al., 2005, Gonzalez et al., 2007, Li et al., 2016a). Un récepteur d'adhésion cellulaire, la α -intégrine (α _{CGH}), a été également identifié dans différentes sous-populations hématocytaires. Cette protéine reconnaît la protéine majoritaire du plasma (*Cg*-EcSOD) via son motif RGD (Arg-Gly-Asp) (Gonzalez et al., 2005, Duperthuy et al., 2011). De plus, certaines études ont proposé que la phagocytose des hyalinocytes soit dépendante de l'intégrine alors que la phagocytose des granulocytes impliquerait d'autres récepteurs fonctionnels (Terahara et al., 2006). Récemment, des PRRs de type toll (TLRs) ont été localisés au niveau de la membrane

plasmique et des endosomes tardifs (Zhang et al., 2013). Ces TLRs, trouvés en grand nombre chez l'huître, partageaient la même organisation structurale, comprenant un peptide signal, un domaine transmembranaire, un domaine TIR et un domaine riche en leucine (LRR) (Zhang et al., 2011b, Zhang et al., 2013). Néanmoins, leurs ligands n'ont pas été encore caractérisés.

II.3.3.2 Les voies de signalisation

Suite à la reconnaissance des PAMPs/DAMPs par les PRRs/PRPs, les voies de signalisation cellulaires sont activées. Cette activation induit l'expression et la production des effecteurs et molécules de signalisation et par suite l'élimination des pathogènes ou des cellules infectées. Chez les invertébrés, plusieurs voies de signalisation activant les mécanismes de la réponse innée ont été mises en évidence et présentent de nombreuses similitudes avec celles des vertébrés.

Chez *Crassostrea gigas*, différentes voies ont pu être caractérisées mettant en évidence la conservation, la complexité et la grande diversité des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse antimicrobienne.

Tout d'abord, plusieurs éléments de la voie NF- κ B ont été caractérisés chez *C. gigas*. En effet, des récepteurs de la famille Toll-like (TLR) jouent un rôle clé dans l'activation de cette voie, appelée aussi la voie Toll/TLR. La liaison du ligand au récepteur TLR entraîne l'activation des protéines adaptatrices (MyD88, Tube) puis l'activation des kinases (I κ B, IRAK, TRAF, TAB, TAK, IKK) et la phosphorylation et la dégradation des protéines inhibitrices Rel (cactus, I κ B). Les inhibiteurs phosphorylés sont dégradés pour libérer les facteurs de transcription Rel, qui sont ensuite transloqués vers le noyau pour activer la transcription de gènes cibles, notamment ceux impliqués dans les réponses immunitaires. Chez *C. gigas*, un facteur de transcription Rel/NF- κ B structurellement lié à la protéine Dorsal des insectes (*Cg*-Rel), une protéine de l'huître I κ B kinase-like (*o*IKK) structurellement liée au IKK- γ des mammifères, et un inhibiteur de NF- κ B (*Cg*-I κ B) ont été caractérisés (Escoubas et al., 1999, Montagnani et al., 2004, Montagnani et al., 2008). De plus, une vingtaine de composants de cette voie ont été mis en évidence grâce au séquençage du génome entier de l'huître en 2012 (Zhang et al., 2012). Différents récepteurs comme des TLRs (Toll-like receptors) et deux TNF-Rs (tumor necrosis factor receptors) ont été

décrits comme susceptibles d'être impliqués dans l'activation de cette voie (de Lorgeril et al., 2011, Zhang et al., 2011a, Zhang et al., 2013, Sun et al., 2014). D'un point de vue fonctionnel, des analyses de plusieurs éléments de cette voie ont montré leur capacité à compléter des voies hétérologues (Escoubas et al., 1999, Gueguen et al., 2003, Montagnani et al., 2004, Montagnani et al., 2008, Roberts et al., 2009, de Lorgeril et al., 2011, Zhang et al., 2011d). Par exemple, *Cg-Rel*, *Cg-I κ B* et *Cg-MyD88*, et les TLRs sont impliqués dans la réponse antimicrobienne (Tirape et al., 2007, Zhang et al., 2011d, Green and Montagnani, 2013, Zhang et al., 2013).

Des éléments de la voie du TGF- β (Transforming growth factor beta) ont été également isolés chez *C. gigas*. On peut citer un récepteur de l'activine/BMP de type II (BMP bone morphogenetic proteins), un récepteur de l'activine de type II, 3 récepteurs de la sous-famille de type I et la plupart des transducteurs de signal Smad activateurs du signal TGF- β (Lelong et al., 2000, Lelong et al., 2001, Herpin et al., 2002, Herpin et al., 2004, Herpin et al., 2005, Herpin et al., 2007, Lelong et al., 2007, Fleury et al., 2008, Le Quere et al., 2009, Corporeau et al., 2011).

Récemment, des travaux de notre équipe ont montré l'implication d'éléments homologues à la voie JAK/STAT dans la réponse antivirale chez l'huître suggérant ainsi l'existence d'une voie Interferon de type 1 (Green and Montagnani, 2013, Green et al., 2014a).

L'activation de ces voies de signalisation intracellulaire entraîne la production de nombreux effecteurs de la réponse immunitaire, incluant des cytokines et des facteurs de transcription.

Chez *C. gigas*, on retrouve le facteur de nécrose tumorale *Cg-TNF1* ainsi que des interleukines IL-17 régulées en réponse à l'infection et à la stimulation par le LPS (Roberts et al., 2008, Li et al., 2014, Sun et al., 2014, Li et al., 2016a). Un facteur de transcription *Cg-LITAF* (Lipopolysaccharide-induced TNF- α factor) a été aussi identifié. Il est impliqué dans l'expression des cytokines inflammatoires, notamment TNF- α , en réponse aux stimulations par le LPS et est fortement induit dans les hémocytes suite à une infection microbienne (Park et al., 2008).

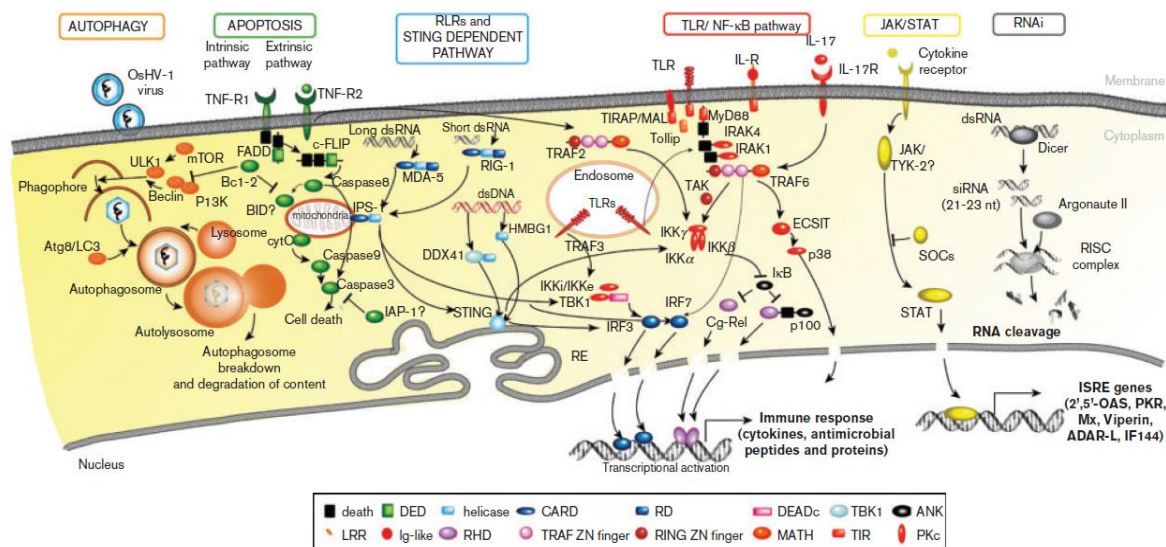


Figure 9. Représentation des voies de signalisation conservées chez l'huître *Crassostrea gigas*.

Ce schéma a été construit sur la base de l'identification de séquences conservées au sein du génome de l'huître. Les domaines caractéristiques des protéines sont indiqués (TIR, Toll/IL1 receptor; Ig, immunoglobulin; DD, death domain; LRR, leucine rich repeat; TM, transmembrane; PKc, protein kinase; RHD, rel homology domain; IPT, immunoglobulin-like fold, plexins, transcription factors; RING, RING-finger (really interesting new gene) domain; zf-TRAF, TRAF type zinc finger; MAT, meprin and TRAF-C homology domain; UBL-TBK1 like, ubiquitin-like domain of human Tbk1 and similar proteins). D'après Montagnani C. dans (Green et al., 2015a).

II.3.3.3 Les réactions de défense

Suite à l'activation par la reconnaissance des PAMPs, les hémocytes migrent vers les sites d'infection ou de blessure où ils transportent des molécules de défense et s'agrègent pour limiter l'infection ou la blessure.

a) La phagocytose

La phagocytose est déclenchée par la reconnaissance des PAMPs des microorganismes pathogènes par les récepteurs présents à la surface des hémocytes. Ce processus est un mécanisme important de l'immunité innée à médiation cellulaire par lequel des particules pathogènes supérieures à $0,5 \mu\text{m}$ sont internalisées à partir du milieu extérieur. D'une manière

générale, la phagocytose se déroule en trois étapes. Tout d'abord, la membrane de la cellule phagocytaire adhère à la particule qu'elle va ingérer ; c'est la **reconnaissance des particules étrangères** qui peut être directe via les PRRs, ou indirecte via le recrutement d'opsonines. On parle alors respectivement de phagocytose non-opsonique ou opsonique. Ensuite, les particules étrangères sont entourées par des pseudopodes grâce à des remaniements du cytosquelette d'actine assurant ainsi leur **internalisation**. Celle-ci entraîne la formation d'une vacuole intracellulaire, appelée phagosome, par la fusion de la membrane plasmique au sommet de ces protrusions cellulaires. **La maturation du phagosome** se fait ensuite par des échanges séquentiels et fusion avec d'autres vésicules cytoplasmiques comme les endosomes (précoces et tardifs) et les lysosomes aboutissant à la formation du phagolysosome. Un environnement microbicide assure ainsi la dégradation des particules phagocytées grâce à une acidification progressive du milieu intra-vacuolaire, à la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNS), à la libération et l'activation de protéases et de peptides antimicrobiens et à l'accumulation de métaux tels que le cuivre et le zinc (Flannagan et al., 2012).

Chez *C. gigas*, le processus de phagocytose a été initialement mis en évidence *in vitro*. En effet, la phagocytose de particules de zymosan (extrait membranaire de levure) induit une forte production de ROS et d'enzymes lysosomiales par les hémocytes (Bachère et al., 1991, Bachère et al., 2004, Poirier et al., 2014). De plus, lorsque l'huître est envahie par de plus gros organismes comme des nématodes ou des champignons, les hémocytes forment des agrégats autour des parasites pour les immobiliser (Schmitt et al., 2012b). Au niveau transcriptomique, une étude menée après une infection par des *Vibrio* pathogènes d'huîtres a permis de mettre en évidence la surexpression de plusieurs gènes impliqués dans le processus de phagocytose, comme les gènes codant l'actine A, des gènes codant des petites GTPases des familles Rho, Rac et Cdc42, qui sont très importantes dans la régulation de l'actine et sont impliquées dans la formation du phagosome chez l'humain, et des gènes codant des protéine-tyrosine kinases de la famille Src nécessaire à la phagocytose (de Lorgeril et al., 2011).

Parmi les différentes populations hémocytaires décrites chez l'huître, les granulocytes et les hyalinocytes sont considérés comme des « phagocytes professionnels » avec une activité de phagocytose plus importante des granulocytes contre les bactéries, les levures mais pas contre les billes de latex (Takahashi and Mori, 2000). Il a été également montré que la phagocytose des

hyalinocytes chez *C. gigas* était dépendante de l'α5β1-intégrine (Terahara et al., 2006) et que le pathogène de l'huître *V. tasmaniensis* LGP32 utilisait les α5β1-intégrines des hémocytes pour les envahir (Duperthuy et al., 2011).

b) Les protéines et peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont des effecteurs multifonctionnels de la défense de l'hôte très conservés dans le règne vivant et dont le rôle le plus connu est celui de tuer les pathogènes. Les AMPs sont des peptides cationiques et amphipatiques qui interagissent avec les membranes des bactéries à Gram négatif (via des interactions électrostatiques avec les lipopolysaccharide chargés négativement) et positif (via les acides teichoïques) (Bulet et al., 2004). Certains AMPs peuvent former des pores dans les membranes bactériennes entraînant ainsi la lyse de la cellule (Brogden, 2005), ou être transloqués dans le cytoplasme où ils interfèrent avec des processus cellulaires vitaux tels que la synthèse des acides nucléiques, de protéines, d'enzymes et de composants de la paroi (Brotz et al., 1998, Park et al., 1998, Kragol et al., 2001, Patrzykat et al., 2002, Srinivasan et al., 2010, Wilmes et al., 2011). Les AMPs peuvent également agir en synergie en combinant leurs mécanismes d'action pour combattre les bactéries pathogènes (Schmitt et al., 2012a) ou être utilisés par les phagocytes pour tuer les micro-organismes qui ont été phagocytés.

Chez *C. gigas*, une large gamme d'AMPs est produite par les hémocytes notamment des défensines, des big-défensines, des peptides riches en proline (*Cg-Prp*), une *Cg-molluscidine* récemment identifiée, ainsi que deux protéines antimicrobiennes, *Cg-BPI* (bacterial/permeability-increased protein) et une *Cg-Mepg1* (macrophage expressed gene 1-like) (Gonzalez et al., 2007, He et al., 2011, Zhang et al., 2011c, Seo et al., 2013). La *Cg-BPI* est stockée dans de larges vacuoles cytoplasmiques mais la localisation des autres peptides n'est pas clairement établie. L'expression de *Cg-BPI*, de *Cg-Mepg1* et des big-défensines 1 et 2 est régulée dans les hémocytes circulants après une infection bactérienne mais l'expression des défensines de la big-défensine 3 est quant à elle constitutive (Gonzalez et al., 2007, He et al., 2011, Rosa et al., 2011). Récemment, des histones présentant des propriétés antimicrobiennes ont été isolées à partir de branchies d'huîtres stimulées par des challenges microbiens ; elles sont

libérées par les hémocytes en réponse à une blessure ou à une infection (Schmitt et al., 2010, Seo et al., 2011, Poirier et al., 2014)

Au delà des AMPs produits par l'huître elle-même, des AMPs sont aussi produits par des bactéries de la flore commensale de l'huître, notamment par des souches de *Pseudoalteromonas* présentes dans l'hémolymphe des huîtres (Defer et al., 2009).

c) Les protéases et les inhibiteurs de protéases

Chez *C. gigas*, des protéases et des inhibiteurs de protéases sont produits par les hémocytes et participent à de nombreuses réactions immunitaires en régulant les cascades de signalisation endogènes (Hibbetts et al., 1999). Les inhibiteurs de protéases peuvent inactiver les protéases sécrétées par certains agents infectieux (Armstrong, 2006). De nombreuses séquences codant des inhibiteurs de protéases ont été identifiées chez l'huître, tels que des serpins, des inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMP) et des α_2 - macroglobulines (Montagnani et al., 2001, Gueguen et al., 2003, Roberts et al., 2009). *Cg*-Timp est exprimé uniquement dans les hémocytes et est modulée suite à des dommages faits à la coquille ou suite à une infection bactérienne (Montagnani et al., 2001, Montagnani et al., 2007).

d) Les lysozymes

Les lysozymes sont des enzymes hydrolytiques cationiques contenues dans les lysosomes qui jouent un rôle important dans la dégradation des microorganismes grâce à leurs propriétés lytiques du peptidoglycane, composant majeur de la paroi cellulaire bactérienne (Bachali et al., 2002).

Chez *C. gigas*, quatre lysozymes ont été identifiées par des approches génomiques et sont exprimés par de nombreux tissus incluant les hémocytes (*CgL*-1 ou *Cg*-lyzol) mais aussi les épithelia comme la glande digestive (*CgL*- 2 ou *Cg_lysoz2*) et le manteau (*CgL*-3 ou *Cg*-lysoz3) (Matsumoto et al., 2006, Itoh and Takahashi, 2007, Itoh et al., 2010, Xue et al., 2010). En accord avec leurs rôles, les lysozymes *CgL*-1 et *CgL*-3 sont actifs contre des bactéries à Gram-positif (Itoh et al., 2010).

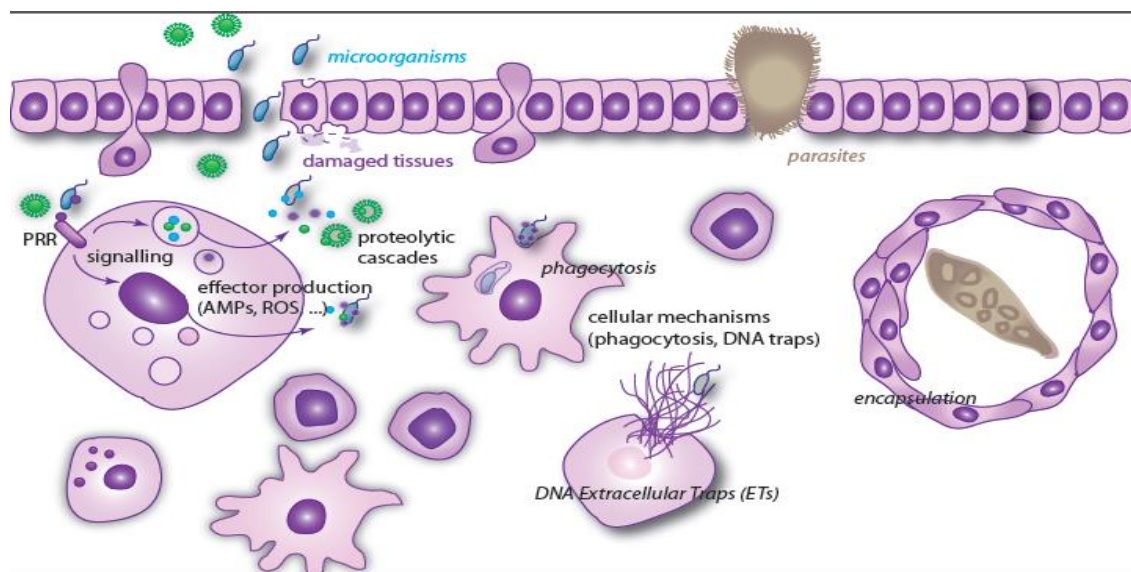


Figure 10. Représentation schématique des principales étapes de la réponse immunitaire innée chez les huîtres.

La première étape dans le processus immunitaire inné est la détection précoce des microorganismes envahisseurs ou des tissus endommagés. La plupart des envahisseurs sont reconnus par des récepteurs associés aux membranes cellulaires (PRRs) de l'hôte qui se lient spécifiquement aux motifs moléculaires conservés exprimés à la surface des microorganismes (MAMPs). Une fois qu'ils se lient à leurs ligands, les PRRs déclenchent l'activation des voies de signalisation intracellulaires qui conduisent à la production de molécules de signalisation. Les hémocytes, attirés par des produits microbiens ou par des molécules de cellules endommagées, migrent ainsi vers le site d'infection. Ils se lient aux microorganismes envahisseurs, les internalisent par phagocytose et les tuent ou les neutralisent. Les PRRs déclenchent également la production d'effecteurs immunitaires (AMP, ROS) qui contribuent aux mécanismes de défense de l'hôte. Les cascades protéolytiques activées dans l'hémolymphe sont également des composants principaux de la réponse immunitaire de l'huître. De plus, parmi les mécanismes cellulaires identifiés chez les huîtres, les pièges extracellulaires d'ADN (ETs) ont récemment été mis en évidence pour capturer les bactéries. D'après Montagnani C. dans (Escoubas et al., 2016).

II.4 Les mortalités des huîtres

a) Origine multifactorielle

En France, depuis la dernière décennie, les huîtres juvéniles cultivées dans les lagunes et les estuaires subissent des épisodes de mortalité estivale. Ces mortalités ont une étiologie multifactorielle impliquant les conditions environnementales, le statut physiologique et/ou génétique de l'huître et la présence de micro-organismes pathogènes (Samain and McCombie, 2008). Depuis 2008, ces phénomènes se sont intensifiés et apparaissent plus tôt dans l'année

lorsque la température de l'eau atteint 16°C. Un virus de type Herpès nommé OsHV-1 est systématiquement retrouvé chez les huîtres moribondes (Saulnier et al., 2009, Saulnier et al., 2010) et un nouveau variant γ -var, apparu depuis 2008, pourrait contribuer à l'aggravation des mortalités (Segarra et al., 2010, Schikorski et al., 2011b, Schikorski et al., 2011a, Segarra et al., 2014). Bien que considérées comme faisant partie de la microflore naturelle de l'huître, les bactéries du genre *Vibrio* ont été également associées à divers épisodes de mortalités. Les souches du clade Splendidus ont été systématiquement retrouvées dans les huîtres moribondes lors des épisodes de mortalités (Lacoste et al., 2001, Gay et al., 2004a, Gay et al., 2004b, Lemire et al., 2015). Ce clade présente une diversité génétique importante et de nombreuses souches ont été isolées et caractérisées lors de mortalités estivales, parmi lesquelles *V. tasmaniensis* LGP32, isolée lors des épisodes de mortalités de 2004 (Lacoste et al., 2001, Gay et al., 2004a, Gay et al., 2004b, Saulnier et al., 2010).

b) Interactions des pathogènes avec le système immunitaire

Vibrio tasmaniensis LGP32 est un pathogène intracellulaire facultatif des hémocytes de l'huître *Crassostrea gigas* qui manipule les mécanismes de défense de l'hôte pour entrer et survivre à l'intérieur des cellules immunitaires (Duperthuy et al., 2011). Une porine OmpU présente au niveau de la membrane externe de ce pathogène est essentielle pour sa virulence : elle est utilisée pour adhérer et envahir les hémocytes après opsonisation par la protéine majoritaire du plasma d'huître, la superoxyde dismutase extracellulaire, *Cg*-EcSOD. En effet, OmpU sert d'adhésine/invasine nécessaire à la reconnaissance par la α -intégrine hémocytaire et à l'invasion de la cellule hôte, et utilise la *Cg*-EcSOD comme une opsonine promouvant la phagocytose OmpU-dépendante via sa séquence RGD. Une fois internalisée, *V. tasmaniensis* LGP32 est capable de survivre en intracellulaire et d'échapper aux défenses de l'hôte en résistant contre les AMPs de l'huître, *Cg*-Def et *Cg*-BPI (Duperthuy et al., 2010), en inhibant la formation de vacuoles acides, en limitant la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNS), et en effluant le cuivre (Duperthuy et al., 2011, Vanhove et al., 2016). Ce pathogène produit également des produits de sécrétion extracellulaire (ECPs) toxiques pour les huîtres et dont la métalloprotéase sécrétée Vsm est le facteur principal de toxicité *in vitro* (Le Roux et al., 2007, Binesse et al., 2008). Des travaux récents de notre équipe portant sur la fraction vésiculaire des ECPs, ont montré que *V. tasmaniensis* LGP32 sécrète des vésicules de membrane externe

(OMVs) qui le protègent contre les peptides antimicrobiens et délivrent des facteurs de virulence aux cellules immunitaires de l'huître (Vanhove et al., 2015).

La réponse de l'huître *C. gigas* à l'infection par *V. tasmaniensis* LGP32 a été étudiée par de Lorgeril et al. en 2011. L'étude a permis d'identifier des petites GTPases de la famille Rab (Rab-like protein 3, Rab6-7, Rab18 et Rab2), et un gène codant une "lysosome-associated membrane glycoprotein" 1 (homologue de LAMP-1 chez l'humain) chez les huîtres ayant survécu à une infection par *V. tasmaniensis* LGP32 (de Lorgeril et al., 2011). Cependant aucune caractérisation fonctionnelle n'a été menée sur ces protéines. Une ATPase vacuolaire impliquée dans l'acidification de la vacuole de phagocytose, l'« ATPase H⁺ transporting lysosomal protein », a été également identifiée chez *C. gigas* (Huvet et al., 2004) et est surexprimée chez les huîtres survivantes à l'infection par *V. tasmaniensis* LGP32 (de Lorgeril et al., 2011). Il a également été démontré que le lysozyme, *CgL-1*, était surexprimé dans les hémocytes des huîtres infectées par ce pathogène (de Lorgeril et al., 2011).

Le virus OsHV-1 est un agent pathogène de l'huître associé aux phénomènes de surmortalités des juvéniles (Segarra et al., 2010, Segarra et al., 2014). Les études menées sur la localisation *in situ* et la distribution tissulaire de protéines de l'herpesvirus 1 au sein de l'huître *Crassostrea gigas* infectée par ce virus, a permis de mettre en évidence des signaux positifs dans le tissu conjonctif des branchies, du manteau, du muscle adducteur, du cœur, de la glande digestive, des palpes labiaux, et des gonades (Lipart and Renault, 2002, Jenkins et al., 2013, Corbeil et al., 2015, Segarra et al., 2015). Des signaux positifs ont également été signalés dans les épithéliums digestifs. Les auteurs suggèrent ainsi que le tissu conjonctif soit un site privilégié pour la réplication d'OsHV-1 même si les signaux positifs ont été observés dans les cellules de l'épithélium des différents organes qui peuvent être interprétés comme un portail hypothétique d'entrée ou de sortie pour le virus (Martenot et al., 2016).

A l'exclusion des organismes modèles (insectes et nématodes), un nombre limité d'études s'est à ce jour penché sur la réponse antivirale chez les invertébrés (Lu et al., 2005, Kemp and Imler, 2009, Escoubas et al., 2016). Si la réponse antivirale a été jusqu'alors moins bien décrite chez les huîtres, les études récentes et l'exploration du génome de *C. gigas* entièrement séquencé depuis 2012 ont révélé la présence d'un répertoire moléculaire complexe nécessaire à la mise en place d'une réponse antivirale. Il s'agit de la conservation des principales voies de la réponse

antivirale aussi connues chez les vertébrés comme l'apoptose, l'autophagie et la voie TLR (He et al., 2015, Zhang et al., 2015, Green et al., 2015a, Green et al., 2016, Zhang et al., 2012). L'implication de ces voies dans la réponse antivirale de l'huître reste cependant à démontrer. L'étude de la réponse de l'huître *C. gigas* à l'infection par le virus OsHV-1 ou le poly I : C (ARN double brin synthétique qui mime des motifs moléculaires viraux et simule une infection virale) a permis de mettre en évidence des changements significatifs dans l'expression de gènes liés à l'immunité comme la surexpression des gènes MyD88, IRF et PKR ainsi que l'implication de réponses spécifiques au virus comme la voie de type « Interferon » (Green and Montagnani, 2013, Renault et al., 2011, Green et al., 2016). Par ailleurs, l'injection préalable de poly I : C permet de diminuer significativement les mortalités et les charges virales au sein d'animaux infectés par OsHV-1. Ces résultats soulignent le rôle joué par ces voies dans la protection antivirale et suggèrent l'existence de mécanismes de priming immunitaire chez l'huître (Schulenburg et al., 2007, Green and Montagnani, 2013).

II.5 Interaction des microalgues productrices de toxines paralysantes avec l'huître creuse *Crassostrea gigas*

II.5.1 Comportement alimentaire des huîtres face aux microalgues toxiques

La contamination des huîtres par les toxines paralysantes produites par les microalgues s'effectue par voie trophique. Une fois ingérées, les cellules algales subissent une dégradation mécanique sous l'action du stylet cristallin mais aussi enzymatique dans l'estomac des huîtres. Cette dégradation s'effectue suivant la nature de la thèque et non suivant la présence ou absence de toxines (Laabir and Gentien, 1999). Les Dinoflagellés à thèque fragile vont rapidement être dégradés alors que ceux à thèque épaisse peuvent se protéger des sucs digestifs présents dans l'estomac et traverser le tube digestif sans être dégradés pour une majorité d'entre eux, ou former instantanément un kyste temporaire ou pelliculaire. La survie de ces kystes dans le tube digestif dépend quant à elle de leur morphologie mais également des processus digestifs (Laabir and Gentien, 1999, Montresor et al., 2003). Les cellules ainsi dégradées dans l'estomac libèrent leur

contenu cellulaire et leurs toxines qui sont dirigés soit vers la glande digestive soit directement vers l'intestin pour être évacués.

Le temps de passage d'algues productrices de PSTs dans le système digestif de l'huître *Crassostrea gigas* ne semble pas être influencé ni par la concentration algale (172 ± 92 min et 213 ± 70 min pour des huîtres nourries avec 200 et 5000 cellules/mL d'*Alexandrium*, respectivement, à une température de 16°C), ni par la température (213 ± 70 min et 205 ± 69 min pour des huîtres nourries avec 5000 cellules/mL d'*Alexandrium* à 16°C et 20°C , respectivement) (Gueguen et al., 2008b). Cependant, une relation entre l'augmentation de la température et la lyse des cellules dans le tube digestif semble être établie. En effet, après 6 heures d'alimentation avec des cellules d'algues toxiques, les matières fécales des huîtres nourries à 20°C présentaient un plus faible pourcentage de cellules toxiques intactes que celles provenant des huîtres nourries à 16°C (Laabir et al., 2007, Gueguen et al., 2008b).

II.5.2 L'effet des microalgues productrices de toxines paralysantes sur l'huître *Crassostrea gigas*

L'exposition de l'huître *Crassostrea gigas* aux microalgues productrices de toxines paralysantes peut affecter négativement ses processus physiologiques. Des études ont montré une diminution de l'activité valvaire et de la filtration (Lassus et al., 1999, Lassus et al., 2004), une inhibition de l'activité d'alimentation (Bardouil et al., 1993, Lassus et al., 2004), un changement de la composition lipidique de la glande digestive notamment une diminution dans son contenu en mono- et di-acylglycérol et en phospholipides (Haberkorn et al., 2010, Haberkorn et al., 2014), une forte réponse inflammatoire dans les différents tissus de la glande digestive (Haberkorn et al., 2010) et une modification de l'expression des gènes codant l' α -amylase et la TLP (Triacylglycerol Lipase Precursor), impliqués dans les mécanismes de digestion (Rolland et al., 2012).

Des effets néfastes sur les cellules immunitaires, les hémocytes, ont également été rapportés, y compris une baisse de la production de ROS et de leurs capacités de phagocytose (Hegaret et al., 2011, Mello et al., 2013, Haberkorn et al., 2014), une diminution de leur adhésion cellulaire ainsi qu'une augmentation de leur pourcentage de mort cellulaire (Hegaret et al., 2011), une

modification de leur taille et une augmentation de leur nombre (Hegaret et al., 2011, Haberkorn et al., 2014), et une augmentation de leur apoptose (Medhioub et al., 2013).

II.5.3 Le devenir des toxines paralysantes chez l'huître *Crassostrea gigas*

L'accumulation des toxines paralysantes dans les huîtres apparaît fréquemment après une phase de latence entre le pic maximal de microalgues toxiques présentes dans la colonne d'eau et le contenu toxinique maximal observé dans l'animal. En effet, la cinétique d'accumulation et d'élimination des PSTs dans les bivalves mollusques résulte d'un équilibre entre le niveau initial de contamination, l'ingestion de l'algue toxique, sa digestion et son assimilation, et les biotransformations et le transfert des toxines au sein des organes et leurs détoxifications (Silvert and Cembella, 1995).

a) La répartition tissulaire des toxines paralysantes chez *Crassostrea gigas*

Plusieurs facteurs influencent le devenir et la distribution des toxines paralysantes dans les mollusques, notamment la toxicité cellulaire de l'algue, les variations individuelles et la dynamique de la prise alimentaire des huîtres, les biotransformations des toxines ainsi que les mécanismes de détoxification au niveau des tissus de l'animal (Lassus et al., 2000).

Chez l'huître *C. gigas* contaminée par des PSTs, on retrouve les toxines dans les différents tissus avec une localisation majoritaire dans la glande digestive qui représente 65 à 95 % du contenu toxinique total (Silvert and Cembella, 1995, Bricelj and Shumway, 1998b, Gueguen et al., 2008a). En effet, Gueguen et al. (2008b) ont montré que les PSTs se répartissent dans les différents tissus de *C. gigas* dès le premier jour de contamination et que l'importance de chaque tissu dans la contribution à la toxicité globale reste la même tout le long du processus de contamination. Ceci permet ainsi de déterminer la contribution de chaque tissu à cette toxicité, soit : glande digestive ($64,10 \pm 9,87$ %) > manteau ($11,02 \pm 4,2$ %) > gonade ($16,00 \pm 10,15$ %) > branchies ($6,36 \pm 2,35$ %) > muscle ($2,25 \pm 0,89$ %).

Cependant, à l'heure actuelle, les voies de transfert des toxines paralysantes dans les tissus des bivalves ne sont pas encore connues.

b) L'élimination des toxines paralysantes par détoxification chez *Crassostrea gigas*

Chez les mollusques bivalves exposés aux mêmes conditions de contaminations algales, la vitesse de détoxification est espèce-spécifique. Sur la base du taux d'élimination journalier des PSTs, une relation exponentielle établie par Bricelj et Shumway en 1998 à partir de données obtenues *in situ* ou par des expérimentations, les bivalves peuvent être classés soit en espèces à détoxification rapide (quelques jours à quelques semaines) soit en espèces à détoxification lente (quelques mois à quelques années) (Bricelj and Shumway, 1998b).

Chez l'huître *C. gigas* exposée *in vivo* à des microalgues productrices de PSTs, les taux de détoxification se situent entre 0,22 et 0,33 d⁻¹ (Lassus et al., 2005, Gueguen et al., 2008a), soit un temps moyen de détoxification de 7 jours. Cependant, la vitesse de détoxification est tissu-spécifique (Blanco, 2004). En effet, plusieurs études ont montré que la glande digestive se détoxifie plus vite que le reste des tissus en raison de la production de fèces et à ses échanges avec les autres tissus (Bricelj et al., 1991, Bricelj and Cembella, 1995). Ainsi, la détoxification des mollusques se fait en deux cinétiques. Une première rapide consistant en une élimination des cellules/fragments cellulaires phytoplanctoniques toxiques ainsi qu'en une perte fécale des vieilles cellules situées autour de la lumière des tubules de la glande digestive, et qui ont accumulé une grande quantité de PSTs. Une seconde cinétique plus lente correspond à l'élimination des toxines incorporées dans les différents tissus et notamment à la dégradation des cellules tubulaires de la glande digestive (Silvert and Cembella, 1995, Blanco et al., 1997, Bricelj and Shumway, 1998b). Les taux de détoxification par organe s'établissent généralement dans l'ordre suivant : masse viscérale > branchies > manteau > muscle adducteur (Bricelj and Cembella, 1995, Bricelj and Shumway, 1998b).

Les mécanismes mis en jeu dans le processus de détoxification sont peu connus. Ils peuvent inclure l'excrétion des particules algales, la dégradation et la biotransformation des toxines. Plusieurs études ont testé l'effet des variables environnementales sur la vitesse de détoxification des huîtres contaminées par des PSTs, comme la température, l'exposition à des stress

thermiques et osmotiques ou à des chocs électriques, l'abaissement du pH et l'ajout de chlore. Cependant aucun effet clair n'a été mis en évidence (Bricelj and Shumway, 1998b, Fernandez et al., 2003, Lassus et al., 2005). Néanmoins, Gueguen et al. (2008b) ont montré que la présence de la matière en suspension (matière organique et inorganique) permet d'accélérer la cinétique de détoxification des huîtres contaminées par des PSTs. En effet, la présence de la matière organique (algue non toxique) durant la phase de détoxification des huîtres, augmente leur activité digestive et permet ainsi d'accélérer les taux d'évacuation, de dégradation et d'excrétion des toxines (Bricelj and Shumway, 1998a). L'ajout de la matière inorganique (argile) à celle organique, quant à elle, augmente la production de pseudofèces (Gueguen et al. 2008b) permettant ainsi le maintien de la fraction organique et son absorption maximale (Méléder et al., 2001).

III. L'APOPTOSE, UNE FORME DE LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE

La mort cellulaire est un processus qui peut survenir soit spontanément soit en présence d'agents cytotoxiques. Différentes études ont permis d'établir aujourd'hui l'existence d'une variété de types de mort cellulaire classés en fonction de l'aspect morphologique (qui peut être apoptotique, nécrotique, autophagique ou associés à la mitose), des critères enzymologiques (avec ou sans la participation des nucléases ou des classes distinctes de protéases, telles que les caspases, les calpaïnes, les cathepsines et les transglutaminases), des aspects fonctionnels (programmée ou accidentelle, physiologique ou pathologique) ou des caractéristiques immunologiques (immunogène ou non immunogène). Ainsi, le comité de la nomenclature sur la mort cellulaire (NCCD) a proposé des critères unifiés pour la définition d'une dizaine de types de mort cellulaire y compris l'apoptose, la nécrose et l'autophagie (Figure 11) (Kroemer et al., 2009, Galluzzi et al., 2012, Galluzzi et al., 2015). Le tableau ci-dessous regroupe les principaux types de mort cellulaire ainsi que leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques principales (Tableau 3).

Principaux types de mort cellulaire	Caractéristiques morphologiques principales	Caractéristiques biochimiques principales
Apoptose	Arrondissement de la cellule Condensation cytoplasmique et nucléaire (pyknosis) Fragmentation nucléaire (karyorrhexis) Pas ou peu de changement morphologique des organites cytoplasmiques Bourgeonnement membranaire (blebbing) Internalisation par les phagocytes	Activation des caspases de l'apoptose Activation des protéines pro-apoptotiques Perméabilisation de la membrane mitochondriale Exposition du phosphatidyl serine
Autophagie	Absence de condensation chromatinienne Vacuolisation massive du cytoplasme Accumulation des vacuoles autophagiques à double membrane Peu ou pas d'internalisation par les phagocytes	Dépend des produits des gènes d'autophagie
Nécrose	Gonflement du cytoplasme (oncosis) et de ses organites Rupture de la membrane plasmique Condensation chromatinienne modérée	Activation des calpaïnes et des cathepsines Baisse des niveaux d'ATP
Cornification	Élimination des organites cytosoliques Modifications de la membrane plasmique Accumulation des lipides dans des granules Desquamation par l'activation des protéases	Expression des transglutaminases et de leurs substrats
Catastrophe mitotique	Micronucleation et multinucleation	Activation des suppresseurs de tumeur TP53 ou de la caspase-2
Pyroptose	Fragmentation nucléaire et bourgeonnement membranaire Réactions inflammatoires	Activation des caspases-1 Sécrétion des interleukines IL-1 et-8
Entose	Aspect cellulaire normal Internalisation par les phagocytes et mort	Activation des hélices contenant des protéines kinase 1 (ROCK 1)

Tableau 3. Les principaux types de mort cellulaire avec les caractéristiques morphologiques et biochimiques principales associées.

Ce tableau est une synthèse des données répertoriées dans (Kroemer et al., 2009, Galluzzi et al., 2012).

De point de vue morphologique, tandis que l'apoptose se manifeste par une réduction du volume du noyau et du cytoplasme, la nécrose, quant à elle, se manifeste par un gonflement et une augmentation du volume cytoplasmique, une rupture de la membrane plasmique, un gonflement des organites cytoplasmiques en particulier les mitochondries, et une condensation modérée de la chromatine. Contrairement à l'apoptose, la nécrose peut être à l'origine d'inflammations et de dommages au niveau des tissus. L'autophagie se distingue par l'accumulation de vacuoles et de membranes (Figure 11) (Galluzzi et al., 2015). Par suite, il est clair que les caractéristiques morphologiques cellulaires et moléculaires doivent être prises en considération lors de la détermination du type de la mort cellulaire.

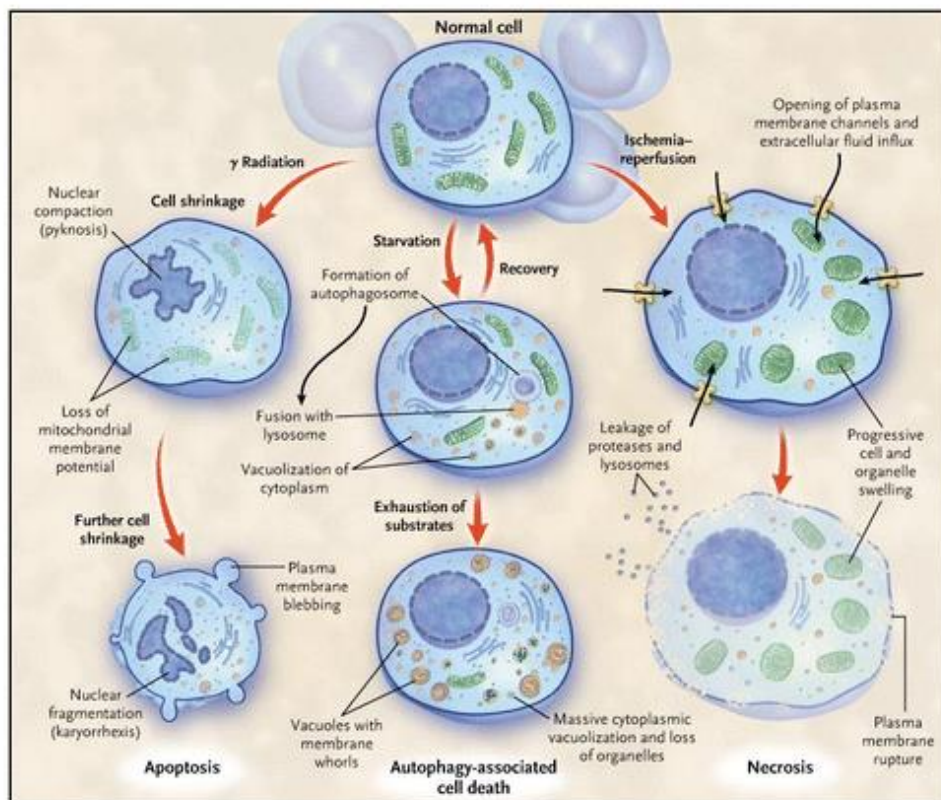


Figure 11. Les changements morphologiques au cours de l'apoptose, l'autophagie et la nécrose.

Ces types de morts cellulaires peuvent être induits par divers stimuli, comme par exemple l'irradiation pour l'apoptose, le manque de substrats pour l'autophagie et l'ischémie-reperfusion pour la nécrose. L'apoptose est caractérisée par le rétrécissement de la cellule et le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique. La nécrose à l'inverse fait intervenir une perméabilisation précoce de la membrane plasmique qui provoque une lyse de la cellule. D'après (Hotchkiss et al., 2009).

III.1 L'apoptose chez les vertébrés

III.1.1 Généralités

a) Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose

La mort cellulaire apoptotique est un processus observé dans une grande variété de tissus et par lequel de multiples types de cellules sont éliminés au cours du développement embryonnaire et fœtal mais aussi à l'âge adulte et notamment de cellules dont l'ADN est endommagé afin de maintenir l'intégrité génomique et l'homéostasie cellulaire (Conradt, 2009). Ce processus essentiel à la vie des organismes pluricellulaires a été identifié en 1962 par Kerr lorsqu'il observait une mort cellulaire particulière dans des lobes de foie de rat soumis à l'ischémie. L'observation histologique de ce phénomène qui différait de la nécrose, mort cellulaire déjà connue, lui a d'abord valu le nom de « shrinkage necrosis » (Kerr, 1965, Kerr, 2002). Ce mécanisme fut nommé « apoptose » par le même groupe en 1972 (dérive du nom grec donné à la chute des feuilles des arbres en automne ; ainsi, la tombée lointaine des cellules des tissus) (Kerr et al., 1972). Bien qu'ils puissent détecter des cellules apoptotiques dans de nombreux cas par microscopie optique, ce sont leurs observations par microscopie électronique à transmission qui ont établi les caractéristiques ultrastructurales considérées aujourd'hui comme la marque de l'apoptose. Ces changements morphologiques caractéristiques comprennent (1) une condensation cytoplasmique et nucléaire (pyknosis) ; (2) une fragmentation nucléaire (karyorrhexis) ; (3) un aspect morphologique normal des organites cytoplasmiques ; et (4) une membrane plasmique intacte avec un « bourgeonnement » membranaire (blebbing) (Figure 11) (Kerr et al., 1972, Wyllie et al., 1980, Galluzzi et al., 2007). Fréquemment, le noyau pycnotique prend l'apparence d'une demi-lune ou forme de croissant, la caractéristique la plus indicative d'une cellule apoptotique. La cellule s'arrondit également avec rétraction des pseudopodes et réduction du volume cellulaire. Suite à la fragmentation nucléaire, la cellule se désagrège en des corps apoptotiques membranaires, qui sont ainsi internalisés par phagocytose par des cellules épithéliales voisines ou des macrophages.

Au cours de ces dernières années, l'évaluation des cellules et de tissus pour l'apoptose a évolué vers le marquage en microscopie optique et l'analyse en cytométrie de flux. Ces

techniques permettent d'observer et de quantifier des phénomènes spécifiques de l'apoptose tels que l'intégrité de la membrane plasmique (révélée par marquage à l'iodure de propidium), l'exposition des phosphatidyl sérines sur la face externe de la membrane plasmique (révélée par marquage à l'annexine V) et la fragmentation de l'ADN (révélée par marquage TUNEL) (Kroemer et al., 2009). De même, comme les événements biochimiques et la signalisation cellulaire impliquée dans la cascade apoptotique ont été révélés, de nouveaux outils pour l'analyse de l'apoptose ont émergé. Un grand nombre de ces outils sont sous la forme d'anticorps dirigés contre les protéines spécifiques impliquées dans les voies apoptotiques, ou contre des néo-épitopes sur les protéines résultant de l'action d'une enzyme activée (Taatjes et al., 2008).

b) Les caspases

Une caractéristique importante de l'apoptose est l'implication d'une famille d'enzymes appelées caspases (Cysteine dependent ASpartate-cleaving proteASES). Chez les mammifères, 14 caspases (dont 12 chez l'Homme) ont été identifiées et classées soit en caspases qui participent au processus apoptotique, ce sont les caspases initiateuses et les caspases effectrices, soit en caspases inflammatoires activées lors de la réponse immunitaire innée et régulant l'inflammation, comme les caspases-1, -4, -5 et -12.

Les caspases sont des protéases strictement cytosoliques possédant un résidu cystéine dans leur site actif et un résidu aspartate dans leur site de clivage. Elles ont une structure conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes appelés pro-caspases. En l'absence de tout stimulus apoptotique, les caspases initiateuses existent sous forme de monomères et les caspases effectrices sous forme de dimères de pro-caspases (Taylor et al., 2008). D'un point de vue structural, les caspases sont constituées de trois parties principales : un pro-domaine de taille et de séquence variables localisé à l'extrémité aminoterminal de la protéine, une grande sous-unité (environ 20 kDa) située au milieu de la molécule et qui contient le site catalytique de l'enzyme, et une petite sous-unité (environ 10 kDa) localisée dans la partie carboxy-terminale (Figure 12) (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). Le pro-domaine est constitué des deux motifs CARD (CAspase Recrutment Domain) et DED (Death Effector Domain) qui permettent une interaction entre les caspases. L'activation des pro-caspases nécessite un clivage au niveau des résidus aspartate présents entre le pro-domaine et la grande sous-unité et entre les deux sous-unités (Figure 12). Bien que le site actif se trouve au niveau de la grande sous-unité,

les deux sous-unités doivent rester associées pour exercer sa fonction catalytique. Les caspases fonctionnent classiquement en hétérotétramères suite à la dimérisation de deux hétérodimères (Pop and Salvesen, 2009).

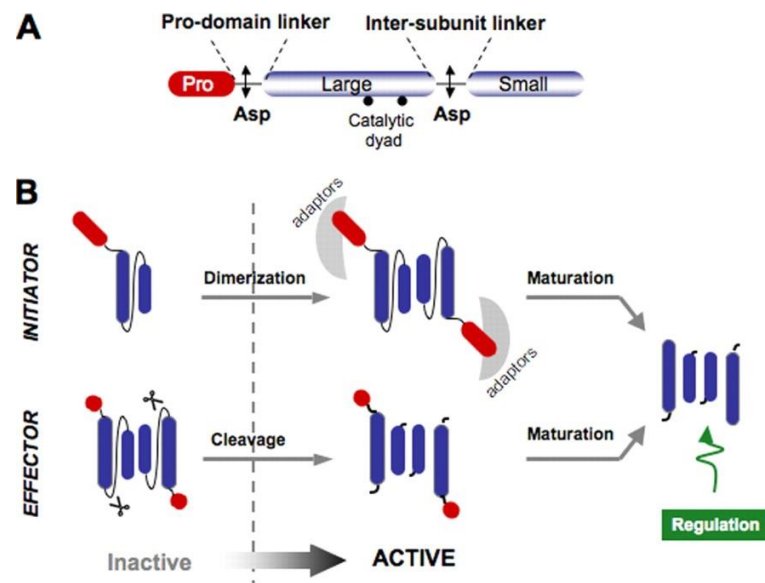


Figure 12. Structure et mécanisme d'activation des caspases.

A : Structure des caspases. Le pro-domaine précède les deux sous-unités. Les sites de clivage au niveau du résidu Asp sont indiqués par des flèches.

B : Le mécanisme d'activation des caspases. Les pro-caspases initiateuses monomériques se dimérisent avant leur activation par clivage au niveau des résidus aspartate (Asp) présents entre le pro-domaine et la grande sous-unité et entre les deux sous-unités. Les pro-caspases effectrices dimériques sont activées par les mêmes clivages que les pro-caspases initiateuses. Les deux sous-unités restent associées. Après activation, des événements protéolytiques additionnels rendent les caspases matures en des formes plus stables. D'après (Pop and Salvesen, 2009).

Les caspases initiateuses (caspases-2,-8, -9 et -10) sont en amont dans la cascade apoptotique et sont capables de s'auto-activer en réponse aux stimuli pro-apoptotiques au sein de complexes multiprotéiques. Une fois activées, elles induisent le clivage des caspases effectrices (caspases -3, -6 et -7) qui, quant à elles, agissent sur des substrats intracellulaires qui contribuent à la destruction de la cellule apoptotique (Taylor et al., 2008). A ce jour, plus de 800 substrats ont été identifiés et classés en fonction de leur importance dans la physiologie, le maintien et le métabolisme de la cellule (Fischer et al., 2003). Différents événements sont ainsi observés comme le clivage des lamines qui explique la condensation nucléaire observée au cours de l'apoptose, et la fragmentation de l'ADN en oligonucléosomes qui est l'une des caractéristiques

des cellules en fin d'apoptose. Cette fragmentation est généralement assurée par la nucléase DFF40/CAD qui coupe l'ADN génomique entre les nucléosomes pour générer des fragments de 180 paires de bases. Cette nucléase existe dans la cellule sous forme de complexe inactif, liée à une chaperonne inhibitrice, la DFF45/ICAD (inhibitor of CAD). Ce complexe est dissocié par l'action de la caspase-3 qui clive DFF45 en trois sites différents et permet à DFF40 de former des dimères qui sont par suite actifs (Samejima et al., 2001).

III.1.2 Les voies d'induction de l'apoptose

D'une manière générale, l'apoptose se déroule en trois étapes : l'initiation, l'exécution et la dégradation cellulaire. L'étape d'initiation de l'apoptose est un phénomène réversible au cours duquel le signal apoptotique (intra ou extracellulaire) est transmis aux caspases initiateuses par des molécules adaptatrices. Ces caspases interviennent dans l'exécution de l'apoptose et conduisent à la dégradation de la cellule (Kroemer et al., 2007). Ainsi, l'apoptose est souvent considérée comme une mort caspases-dépendante. Mais si les caspases initiateuses et effectrices, impliquées dans le processus apoptotiques, différencient clairement l'apoptose de la nécrose et de la pyroptose notamment, il existe aussi une mort apoptotique caspases-indépendante. En effet, la mort cellulaire par apoptose est connue pour se produire à travers deux voies primaires, une voie extrinsèque caspases-dépendante impliquant les récepteurs de mort, et une voie intrinsèque par l'intermédiaire de membres de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) et qui peut être caspases-dépendantes ou -indépendantes (Adams and Cory, 1998).

III.1.2.1 La voie extrinsèque de l'apoptose

La voie dite extrinsèque est induite par la fixation de ligands spécifiques de type cytokines sur des récepteurs de surface appelés récepteurs de mort appartenant à la superfamille des récepteurs du « Tumor Necrosis Factor » (TNFR), incluant des récepteurs TNF (TNFR-1, TNFR-2), le récepteur Fas (CD95/APO1) et des récepteurs TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) comme DR-4 et DR-5 (Figure 13) (Ashkenazi, 2002). La fixation du ligand sur

le récepteur induit l'activation de ce dernier suite à son oligomérisation. Des protéines adaptatrices de type FADD (Fas Associated Death Domain) ou TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain) sont ainsi recrutées par des interactions entre les domaines de mort (DD- Death Domain) retrouvés à la fois au niveau des récepteurs et des protéines adaptatrices (Krueger et al., 2003). Un second domaine d'interaction protéique des protéines adaptatrices appelé DED (Death Effector Domain) interagit ensuite avec le domaine DED des caspases initiateuses, les pro-caspases-8 et -10, formant un complexe appelé DISC (Death Inducing Signaling Complex) (Boatright and Salvesen, 2003). La formation du DISC augmente la concentration locale des caspases et permet le rapprochement des pro-caspases initiateuses -8 et -10 qui s'activent ainsi par clivage séquentiel au niveau de leur résidu aspartate (Salvesen and Dixit, 1999). La caspase-8 activée déclenche la phase d'exécution par l'activation directe des caspases effectrices -3, -6 et -7 (Figure 13) ou via l'activation de la voie intrinsèque ou mitochondriale de l'apoptose.

Dans ce dernier cas, la caspase-8 activée clive une petite protéine Bid (BH3 interacting domain death agonist), membre de la famille Bcl-2 pour former une forme tronquée de Bid appelée tBid (Figure 13) (Li et al., 1998). tBid est alors rapidement transloquée du cytosol vers la membrane mitochondriale où elle se lie à d'autres protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bax (BCL2-associated X protein) et induit l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose qui se traduit par un « breakdown » de la mitochondrie (Luo et al., 1998).

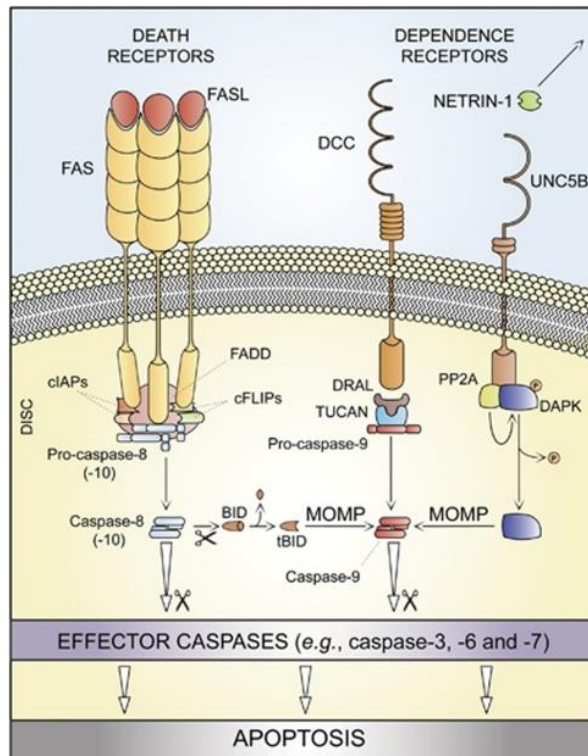


Figure 13. La voie extrinsèque de l'apoptose.

La fixation du ligand FASL sur le récepteur FAS induit l'activation de ce dernier et le recrutement des protéines adaptatrices de type FADD, qui interagissent avec les caspases initiatrices, les pro-caspases-8 et -10, formant un complexe appelé DISC. Au sein de ce complexe, c-FLIP et cIAPs exercent des fonctions anti-apoptotiques. Lorsque les signaux pro-apoptotiques prévalent, la caspase-8 sera activée et peut déclencher directement la cascade des caspases effectrices ou stimuler la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) en clivant BID.

La voie extrinsèque peut également être induite par les récepteurs DCC ou UNC5B en l'absence de leur ligand (nétrine-1). Dans ce cas, les signaux pro-apoptotiques procèdent soit par l'assemblage d'un DRAL et TUCAN qui activent la caspase-9, soit par DAPK lié à PP2A qui DAPK1 qui stimule la MOMP. D'après (Galluzzi et al., 2012).

III.1.2.2 La voie intrinsèque de l'apoptose

La voie intrinsèque, ou mitochondriale, peut également être induite par une variété de facteurs de stress cellulaire incluant l'exposition à des radiations UV, aux métaux lourds et une surproduction des ROS (Kroemer, 2003).

En effet, les ROS peuvent altérer des constituants cellulaires via la génération de produits de stress oxydatif toxiques tels que le radical superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$).

Les lysosomes peuvent également participer à l'induction de l'apoptose suite à la perméabilisation de leurs membranes. En effet, les lysosomes sont des vésicules qui contiennent des enzymes nécessaires pour la digestion des macromolécules cellulaires. Plusieurs stimuli induisent la perméabilisation de la membrane lysosomiale permettant ainsi la libération des hydrolases, telles que les cathepsines capables d'initier l'apoptose dépendante ou indépendante de la voie des caspases (Guicciardi et al., 2004). Cette perméabilisation peut être à l'origine de la perméabilisation mitochondriale mais aussi à l'issue de celle-ci. Le peroxyde d'hydrogène, issu de la mitochondrie, peut par exemple réagir avec des molécules de fer présentes dans les lysosomes et produire ainsi des radicaux hydroxyles qui attaquent aussi bien les membranes lysosomiales que les membranes des autres organites cellulaires. Cette réaction est appelée réaction de Fenton (Zhao et al., 2003).

Le réticulum endoplasmique (RE) peut aussi activer la voie intrinsèque lors d'un stress rigoureux induit par l'accumulation des protéines de conformation anormale au sein de cet organite (Schroder, 2006).

Ce stress cellulaire est par suite détecté par des capteurs incluant des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 qui vont permettre la libération des protéines pro-apoptotiques (Cory et al., 2003). Cette libération s'en suit par un dérèglement morphologique et fonctionnel de la mitochondrie provoquant une entrée anormale d'eau et d'électrolytes au sein de l'organite et son gonflement. La modification des concentrations ioniques internes entraîne l'altération de la membrane externe de la mitochondrie associée à une modification de la perméabilité de la membrane interne conduisant alors à des variations du potentiel mitochondrial transmembranaire (Figure 14) (Saelens et al., 2004).

a) La voie intrinsèque caspases-dépendante

Suite aux variations du potentiel mitochondrial transmembranaire, des protéines inhibitrices des IAPs (Inhibitor of Apoptosis) comme Smac/Diablo et Omi/HtrA2, et la fraction soluble du

cytochrome c sont relâchées dans le cytosol (Verhagen et al., 2000, Martins et al., 2002). Le cytochrome c libéré déclenche la formation d'un complexe nommé apoptosome (formé de cytochrome-c, Apaf-1, ATP et pro-caspase-9) au sein duquel la caspase initiateur 9 s'active. L'apoptosome actif est à l'origine du recrutement et de l'activation des caspases effectrices -3 -6 et -7 conduisant à la dégradation des composants cellulaires (Figure 14) (Slee et al., 1999). Parmi ceux-ci, le clivage d'un inhibiteur d'ADNase caspase activée (ICAD) qui permet à la DNase de dégrader l'ADN. Ce processus est fondamental pour divers essais de ruptures d'ADN comme le TUNEL ou le TMRNEL (réaction TUNEL couplée au fluorochrome TMR).

b) La voie intrinsèque caspases-indépendante

Parmi les facteurs apoptogènes relargués hors de la mitochondrie, on trouve des facteurs apoptogènes qui ne vont pas activer la cascade des caspases, mais une voie caspases-indépendante. Ce sont les facteurs AIF (Apoptosis-Inducing Factor) et EndoG (Endonucléase G) (Figure 14).

Le facteur AIF est synthétisé sous forme de précurseur de 67 kDa dans le cytoplasme puis importé dans la mitochondrie grâce à sa séquence de localisation mitochondriale (MLS) (Susin et al., 1999, Otera et al., 2005). Une fois dans la mitochondrie, la séquence MLS est excisée par une peptidase mitochondriale générant une protéine mature de 62 kDa. AIF est en fait ancré à la membrane interne de la mitochondrie via sa région N-terminale où il exerce une activité NADH oxydase (Otera et al., 2005, Miramar et al., 2001). L'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose par un stress cellulaire implique une augmentation du calcium intracellulaire de la mitochondrie. Cette augmentation permet à la calpaïne-I, une protéase calcium dépendante, de cliver le facteur AIF qui peut ainsi s'exporter vers le cytosol (Norberg et al., 2008). Une fois dans le cytosol, AIF amplifierait sa propre libération (Susin et al., 1999). Le transport vers le noyau se fait ensuite grâce à une séquence de localisation nucléaire (Modjtahedi et al., 2006). Dans le noyau, il a été suggéré que le facteur AIF interagit directement avec l'ADN et induit une condensation périphérique de la chromatine ainsi qu'un clivage de l'ADN en fragments d'environ 50 kb par le recrutement ou l'activation des endonucléases (Ye et al., 2002).

Le facteur EndoG est une nucléase mitochondriale non-spécifique de 30 kDa localisée également dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Li et al., 2001). L'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose conduit à sa libération dans le cytosol puis à sa translocation dans le noyau. EndoG digère l'ADN en l'absence d'activité caspase et en l'absence de la nucléase caspase-dépendante (van Loo et al., 2001). Elle pourrait agir avec l'exonucléase et la DNase I dans le noyau pour générer les fragments d'ADN de haut poids moléculaire ou des fragments oligonucléosomiques (Samejima et al., 2001).

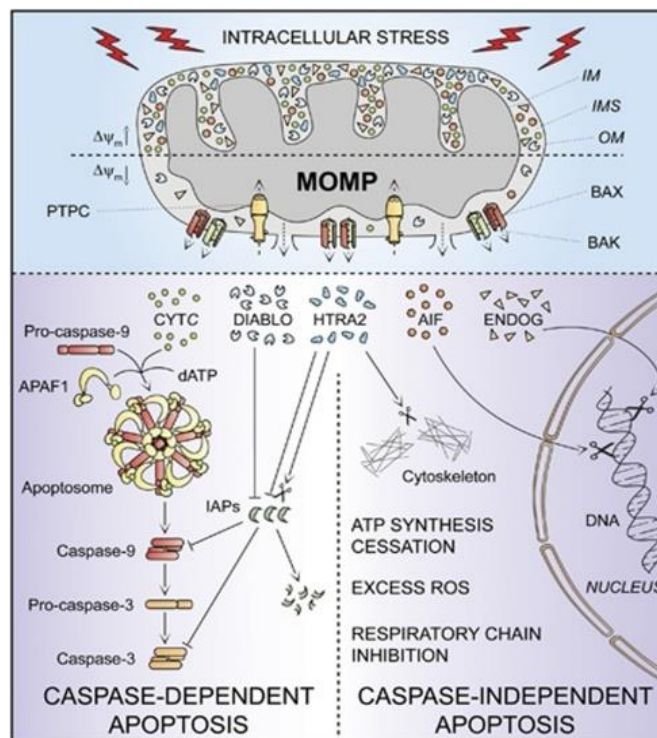


Figure 14. La voie intrinsèque de l'apoptose.

Une variété de facteurs de stress cellulaire est générée et converge vers un mécanisme de contrôle mitochondrial. Lorsque les signaux pro-apoptotiques prévalent, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) conduit à la dissipation du potentiel mitochondrial transmembranaire ($\Delta\psi_m$) et à la libération dans le cytosol de protéines normalement confinées dans l'espace inter-membranaire mitochondrial (IMS). Parmi ceux-ci, le cytochrome c (CYTC) qui avec APAF1, l'ATP et la pro-caspase-9 forme l'apoptosome qui déclenche l'activation de la cascade protéolytique caspase-9 → caspase-3. DIABLO / SMAC et HTRA2 facilitent l'activation des caspases en séquestrant et/ou dégradant plusieurs membres de la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP).

Au contraire, AIF et END OG induisent l'apoptose d'une manière caspases-indépendante en se déplaçant vers le noyau et en induisant la fragmentation de l'ADN. HTRA2 contribue également à la voie caspases-indépendante par le clivage d'une vaste gamme de substrats cellulaires y compris des protéines du cytosquelette. D'après (Galluzzi et al., 2012).

III.1.3 Les protéines régulatrices de l'apoptose

La famille Bcl-2 regroupe des protéines possédant une activité pro-apoptotique mais aussi des protéines possédant une activité anti-apoptotique. Ces régulateurs de l'apoptose participent à la décision d'entrée en apoptose ou de survie au cours de l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. D'un point de vue structural, la famille Bcl-2 se caractérise par la présence d'un ou plusieurs domaines homologues, appelés BH (BH1 à BH4) (Figure 15). Ces régions permettent aux macromolécules de se lier entre elles par dimérisation. Les protéines pro-apoptotiques regroupent des molécules qui ne possèdent qu'un seul domaine BH, comme les protéines BH3-only (Bim, Bik ou Bad), ou plusieurs domaines BH, comme Bax et Bak. Toutes les protéines anti-apoptotiques, comme Bcl-2, Bcl-x_L ou Bcl-w, possèdent les quatre domaines (Figure 15). En effet, il a été montré que les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L inhibent la perméabilisation des membranes mitochondriales dans des protéoliposomes, des mitochondries isolées et des cellules. De même, Bcl-2 renforce la résistance des cellules au stress oxydatif en maintenant la fermeture des pores mitochondriaux (Marzo et al., 1998, Armstrong, 2006). Concernant leurs actions, les BH3-only agissent comme des sentinelles, c'est à dire que lors d'un signal de stress, elles vont inhiber les anti-apoptotiques en se fixant par des liaisons hydrophobes et permettre la libération des protéines pro-apoptotiques à multi-domaines BH (Rautureau et al., 2010).

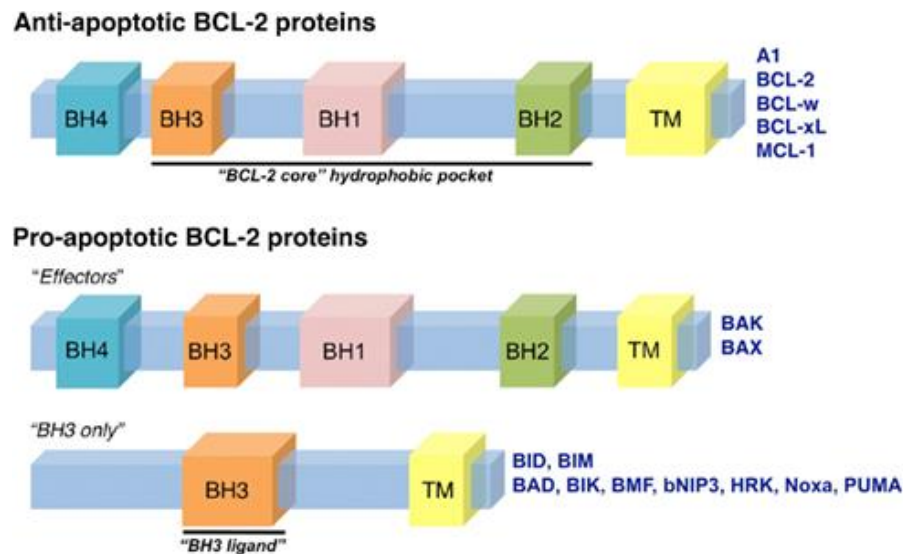


Figure 15. Représentation schématique des différents types de protéines de la famille Bcl-2.

La famille Bcl-2 regroupe des protéines anti-apoptotiques, comme Bcl-2, Bcl-w et Bcl-x_L, qui possèdent les quatre domaines BH (BH1-4) et des protéines pro-apoptotiques qui ne possèdent qu'un seul domaine BH, comme les protéines BH3-only (BID, BIM, BAD, BIK, BMF, bNIP3, HRK, Noxa, PUMA), ou plusieurs domaines BH, comme BAK et BAX. D'après (Anvekar et al., 2011).

Les inhibiteurs de l'apoptose (IAPs) sont des protéines qui empêchent le clivage des caspases nécessaire à leur activation. Les membres de cette famille sont : XIAP (X-linked IAP), cIAP1 et 2 (cellular IAP), Survivin, Livin ou ML-IAP (Melanoma IAP), Ts-IAP (Testis-specific IAP), NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein) et BRUCE/Apollon. Cette famille se caractérise par la présence d'un motif peptidique conservé appelé BIR (Baculovirus IAP Repeats) qui peut être répété plusieurs fois et qui est nécessaire à la liaison et à l'inhibition des caspases (Fesik and Shi, 2001). Les mécanismes d'action des protéines IAP ne sont pas totalement élucidés mais leur activité dépend du domaine BIR. L'activité de la survivine ne se limite pas aux caspases, mais elle est étroitement liée au cycle cellulaire et elle bloque également d'autres facteurs qui interviennent notamment dans la fragmentation de l'ADN (Wrzesien-Kus et al., 2004). Certaines études suggèrent que seul XIAP serait en réalité capable d'inhiber directement les caspases grâce à la présence exclusive de deux séquences au sein de son BIR nécessaires pour inhiber les caspases. Il s'agit d'une séquence d'interaction IBM (IAP binding motif) et d'une séquence inhibitrice. Les autres IAPs interagiraient avec les caspases sans les inhiber directement (Eckelman et al., 2006). Par exemple, les c-IAPs inactivent les caspases en induisant des dégradations protéiques via l'ubiquitination de protéines des complexes en aval du

TNFR qui participent à l'activation de la caspase 8 (Eckelman et al., 2006, Gyrd-Hansen and Meier, 2010).

Les protéines inhibitrices à domaine CARD ou DED sont des molécules catalytiquement inactives qui miment les caspases par leur domaine CARD ou DED. Elles empêchent ainsi le recrutement et l'oligomérisation des caspases et par suite inhibent l'apoptose. La protéine cellulaire c-FLIP (cellular FLice Inhibitory Protein) possède un domaine DED qui se fixe aux pro-domaines des pro-caspases-8 empêchant leur recrutement et bloquant ainsi l'induction de l'apoptose par voie extrinsèque (Kataoka, 2005).

III.2 L'apoptose chez *Crassostrea gigas*

Chez l'huître *Crassostrea gigas*, la voie de l'apoptose est conservée (Zhang et al., 2012). Comme chez les vertébrés, le processus apoptotique chez l'huître est impliqué dans le maintien de l'homéostasie tissulaire mais aussi dans la réponse immunitaire qui peut être déclenchée par une variété de stimuli, y compris des cytokines, des hormones, des agressions toxiques, des virus, des bactéries et des parasites protozoaires (Sokolova, 2009). Des études récentes de génomique et transcriptomique chez l'huître ont révélé plusieurs gènes et protéines impliqués dans l'apoptose ainsi que dans sa régulation. Ainsi, l'apoptose chez *C. gigas* semble être similaire en complexité à l'apoptose chez les vertébrés, mais avec des caractéristiques uniques liées à l'exposition récurrente des animaux aux changements environnementaux, aux polluants et aux agents pathogènes (Zhang et al., 2011b, Zhang et al., 2012). Cependant, les mécanismes sous-jacents à l'induction ou à la régulation de l'apoptose par un agent pathogène restent peu élucidés (Romero et al., 2015).

a) Les caspases

Chez l'huître *Crassostrea gigas*, plusieurs caspases ont été identifiées et caractérisées comme les *Cg*-caspases-2 et -8 identifiées comme caspases initiatrices, et les *Cg*-caspases-1, -3 et -7 identifiées comme caspases effectrices capables d'induire la mort cellulaire (Zhang et al., 2011b,

Qu et al., 2014). A titre d'exemple, le gène codant la *Cg*-caspase-3 est un gène caspase-3-like qui code pour une protéine contenant les domaines p20 et p10 et un motif conservé du site actif.

Au niveau transcriptomique, une étude menée après l'installation des larves de huître sur le substrat, a montré que les *Cg*-caspases-1 et -3 étaient surexprimées dans plusieurs tissus, surtout dans les branchies (Qu et al., 2014). Une étude plus récente a montré ensuite que la surexpression de la *Cg*-caspase-3 induit l'exposition des phosphatidyl sérines sur la face externe de la membrane plasmique des hémocytes et le clivage de la poly (ADP-ribose) polymérase induisant ainsi l'apoptose. De plus, la *Cg*-caspase-3 sert de récepteur immunitaire intracellulaire spécifique pour le LPS et cette interaction inhibe spécifiquement l'apoptose cellulaire induite par cette caspase (Xu et al., 2016). Certaines caspases sont surexprimées suite à une infection bactérienne comme les *Cg*-caspases-1 et -2 surexprimées suite à une infection par *Vibrio anguillarum* (Zhang et al., 2011b) ; d'autres sont surexprimées suite à un challenge par le poly IC, comme la *Cg*-caspase-8, suggérant son implication dans la réponse anti-virale (Li et al., 2015).

b) L'induction des voies apoptotiques

Chez huître *Crassostrea gigas*, le séquençage du génome a révélé l'existence de plusieurs gènes clés impliqués dans la voie intrinsèque comme les gènes codant *Cg*-Bax, *Cg*-Bak, *Cg*-Bag, *Cg*-Bcl2, BI1 et des pro-caspases, mais aussi dans la voie extrinsèque comme les gènes codant des TNFR et la *Cg*-caspase-8 (Zhang et al., 2012).

L'activation de la voie caspases-dépendante a été mise en évidence suite à l'exposition des huîtres à la noradrenaline qui est capable d'induire l'apoptose des hémocytes via une voie de signalisation bêta-adrénergique et à travers la voie dépendante des caspases (Lacoste et al., 2002). De même, Teraha et al ont montré que des peptides à domaine RGD, connus pour fonctionner comme un ligand d'intégrine, induisent également l'apoptose *in vitro* des hémocytes de *C. gigas* (Terahara et al., 2003). Le même groupe a ensuite démontré que l'adhésion des hémocytes médiée par une molécule intégrine-like, déclenche l'apoptose suggérant que l'activation des intégrines contribue à l'induction de la mort cellulaire (Terahara et al., 2005). Récemment, des analyses bioinformatique et transcriptomique ont montré que la *Cg*-TNF peut activer les facteurs de transcription NF- κ B et HSF (heat shock transcription factor) via la voie de

signalisation MAPK et réguler ensuite l'apoptose des hémocytes. En effet, les hémocytes activés libèrent des neurotransmetteurs comme l'acétylcholine et la norepinephrine qui inhibent leur apoptose, et le [Met(5)]-enkephalin qui l'induit (Liu et al., 2016b).

L'apoptose chez *C. gigas* peut être également déclenchée en réponse à des stress environnementaux. En effet, l'exposition de *C. gigas* à la micro-algue toxique *Alexandrium catenella* induit l'apoptose des hémocytes circulants et la surexpression des gènes pro-apoptotique *Cg-Bax* et *Cg-Bax-like* ainsi que les gènes codant les caspases effectrices -3 et -7 (Medhioub et al., 2013). En 2014, Rolland et al suggèrent que ce mécanisme de défense, induit dans les hémocytes, serait contrôlé dans la glande digestive d'huîtres exposées à *A. catenella* (Rolland et al., 2014). Une autre étude suggère que l'exposition de *C. gigas* aux eaux usées pourrait induire l'apoptose des hémocytes ainsi que des dommages de l'ADN suite aux changements dans l'expression des protéines liées au cytosquelette, à la voie d'ubiquitination et au cycle cellulaire (Flores-Nunes et al., 2015). Plus récemment, il a été montré que l'acidification de l'océan ainsi que l'exposition des huîtres à des pourcentages élevés de CO₂ provoquent une augmentation de la production des espèces réactives d'oxygène (ROS) dans les hémocytes accompagnée d'une augmentation du taux de l'apoptose détecté dans ces cellules (Wang et al., 2016).

c) Les protéines anti-apoptotiques

Chez l'huître *Crassostrea gigas*, un système anti-apoptotique puissant existe. En effet, le génome de l'huître possède 48 gènes codant des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs) contre 8 chez l'homme et 7 chez les oursins (Zhang et al., 2012).

Des études transcriptomiques ont montré que l'exposition au stress, notamment l'exposition à l'air, à la chaleur et à de faibles salinités, induit la surexpression de cinq *Cg*-IAPs et des inhibiteurs de l'apoptose *Cg-Bcl-2* et *Cg-Bag* (Zhang et al., 2012). *Cg*-IAP1 est également surexprimé suite à une infection par *Vibrio anguillarum* (Zhang et al., 2011b). Plus récemment, un nouveau gène XIAP-like spécifique de l'huître, *Cg*-IAP2, a été caractérisé et regroupé dans la branche des invertébrés. Il possède une protéine déduite contenant un domaine RING et deux domaines BIR et dont le BIR2 était nécessaire et suffisant pour l'interaction avec la caspase initiateur *Cg*-caspase-2. Au niveau transcriptomique, le gène codant la *Cg*-IAP2 était surexprimé

dans les branchies et les palpes labiales ainsi qu'après un challenge bactérien suggérant son implication dans l'inhibition de l'apoptose (Qu et al., 2015).

Une nouvelle lectine, *Cg-Siglec-1*, localisée dans différents tissus notamment dans la membrane cytoplasmique des hémocytes, a été identifiée pour sa capacité à inhiber l'apoptose induite par le LPS et le relargage de cytokine comme la *Cg-TNF-1* (Liu et al., 2016a). D'une façon similaire, l'addition de l'acide γ -aminobutyrique GABA, un neurotransmetteur inhibiteur supprimant les réactions à médiation immunitaire pro-inflammatoire, réprime l'apoptose des hémocytes induite par le LPS (Li et al., 2016a). Un nouveau gène, *Cg-VDAC2*, codant le canal voltage dépendant VDAC qui joue un rôle essentiel dans la perméabilité mitochondriale et le relargage du cytochrome c, a été également identifié et caractérisé pour ses effets anti-apoptotiques. L'étude a montré que *Cg-VDAC2* est fortement induit dans différents tissus et stage de développement de l'huître ainsi que suite à l'infection par l'herpès virus OsHV-1. De plus, sa surexpression supprime l'apoptose des hémocytes induite par une irradiation UV en inhibant le gène pro-apoptotique *Cg-Bak*. *Cg-VDAC2* a été également co-localisé avec les mitochondries dans les cellules HeLa (Li et al., 2016b).

d) L'induction de l'apoptose par les pathogènes de l'huître

Chez l'huître *Crassostrea gigas*, une étude menée après une infection par des *Vibrio* pathogènes d'huîtres a permis de mettre en évidence la surexpression de plusieurs gènes impliqués dans les voies de l'apoptose comme les gènes pro-apoptotiques codant des caspases et le cytochrome c et des gènes anti-apoptotiques codant des IAPs à multi-domaine BIR (de Lorgeril et al., 2011). Une autre étude a montré que trois gènes pro-apoptotiques (les *Cg-caspases-1* et *-2*, et *FADD*) et un gène anti-apoptotique (*Cg-IAP1*) sont surexprimés suite à une infection par *Vibrio anguillarum* (Zhang et al., 2011b).

Le virus herpès OsHV-1, pathogène de l'huître, est également associé à des phénomènes apoptotiques. En 2000, Renault et al ont suggéré que l'herpès virus pourrait induire l'apoptose des hémocytes d'huîtres suite aux observations simultanées en microscopie électronique de particules virales herpétiques et une chromatine condensée accompagnée d'une fragmentation péri-nucléaire (Renault et al., 2000). Plusieurs études ont ensuite montré la surexpression de gènes anti-apoptotiques impliqués dans la voie intrinsèque de l'apoptose suite à une infection par ce virus, comme la surexpression de gène codant la *Cg-Bcl2* (Renault et al., 2011). Des études

plus récentes ont montré que les composants de la voie extrinsèque de l'apoptose ont été induits en réponse à l'infection par OsHV-1. De même, des IAPs codés par OsHV-1 ont été fortement exprimés lors de la phase aigue de l'infection suggérant l'activation de l'apoptose chez *C. gigas* (Green et al., 2015b).

Enfin, les phénomènes anti-apoptotiques semblent être importants chez les huîtres infectées par les pathogènes. Un équilibre entre les facteurs pro- et anti-apoptotiques pourrait exister. Dans les cellules d'huîtres infectées par les pathogènes ou exposées aux différents stress environnementaux, l'apoptose pourrait ainsi soit être activée soit être inhibée selon la nature et l'évolution de l'infection ou de l'exposition, mais aussi selon le statut physiologique des huîtres.

CHAPITRE II:

RESULTATS

Section A.

**L'exposition à la microalgue productrice de toxines
paralysantes *Alexandrium catenella* augmente
la susceptibilité de l'huître *Crassostrea gigas*
aux vibrios pathogènes**

CHAPITRE II : RESULTATS

SECTION A

L'exposition à la microalgue productrice de toxines paralysantes *Alexandrium catenella* augmente la susceptibilité de l'huître *Crassostrea gigas* aux vibrios pathogènes.

Afin d'étudier l'implication potentielle de la microalgue productrice de toxines paralysantes (PSTs), *Alexandrium catenella*, dans les phénomènes de mortalités de l'huître *Crassostrea gigas*, nous avons suivi sa dynamique dans la lagune de Thau au niveau d'une ferme conchylicole à l'aide d'une approche moléculaire couplée à une approche cellulaire s'appuyant sur un échantillonnage mensuel de la colonne d'eau de novembre 2013 jusqu'à juin 2014. Nous avons également suivi la contamination des animaux par les PSTs en incubant des huîtres juvéniles dans la lagune au niveau de la même ferme en novembre 2013 et en échantillonnant cinq huîtres chaque mois pour l'analyse chimique des toxines dans leurs tissus. En parallèle, la mortalité des huîtres juvéniles a été suivie dans la lagune de Thau par le RESeau d'Observations Conchylicoles de l'Ifremer (RESCO).

Les résultats obtenus ont montré qu'au moment des mortalités des huîtres, les cellules d'*A. catenella* étaient présentes dans la colonne d'eau et que les huîtres étaient contaminées par les PSTs.

Dans un deuxième temps, ces données nous ont amenés à tester en conditions expérimentales contrôlées l'effet de cette microalgue toxique sur les mortalités d'huîtres juvéniles induites par le pathogène *Vibrio tasmaniensis* LGP32 qui est associé aux mortalités d'huîtres. Pour cela, des huîtres ont été exposées soit au dinoflagellé toxique *A. catenella* soit au dinoflagellé non toxique *Alexandrium tamarense*, soit à l'algue fourragère *Tysochrisis lutea*.

Les résultats obtenus ont montré que l'exposition des huîtres juvéniles au dinoflagellé toxique *A. catenella* augmente significativement leur sensibilité à *V. tasmaniensis* LGP32. Au contraire, l'exposition au dinoflagellé non toxique *A. tamarense* ou à l'algue fourragère *T. lutea* n'a pas d'effet sur la sensibilité des huîtres aux vibrios pathogènes.

En conclusion, cette étude montre pour la première fois qu'*A. catenella*, productrice de toxines paralysantes (PSTs), augmente la sensibilité de *C. gigas* à *V. tasmaniensis* LGP32, un vibrio associé aux surmortalités d'huîtres. Nous montrons également la présence de toxines algales dans la chair d'huîtres au moment des mortalités dans la lagune de Thau. L'ensemble de nos résultats suggère que l'exposition aux algues toxiques pourrait représenter un facteur aggravant dans la maladie des huîtres juvéniles en zone d'efflorescences algales toxiques.

Publication 1 :

Les résultats de ces travaux sont présentés dans la publication 1 :

Celina Abi-khalil, Carmen Lopez-Joven, Eric Abadie, Veronique Savar, Zouher Amzil, Mohamed Laabir, Jean-Luc Rolland, 2016, **Exposure to the Paralytic Shellfish Toxin Producer *Alexandrium catenella* Increases the Susceptibility of the Oyster *Crassostrea gigas* to Pathogenic Vibrios.** *Toxins* (Basel) 8(1). doi: 10.3390/toxins8010024. Epub 2016 Jan 15.

Article

Exposure to the Paralytic Shellfish Toxin Producer *Alexandrium catenella* Increases the Susceptibility of the Oyster *Crassostrea gigas* to Pathogenic Vibrios

Celina Abi-Khalil ¹, Carmen Lopez-Joven ¹, Eric Abadie ², Veronique Savar ³, Zouher Amzil ³, Mohamed Laabir ² and Jean-Luc Rolland ^{1,*}

Received: 4 December 2015; Accepted: 7 January 2016; Published: 15 January 2016

Academic Editor: Luis M. Botana

¹ Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Interactions-Hôtes-Pathogènes-Environnements (IHPE UMR 5244), University of Perpignan Via Domitia, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), University of Montpellier, Montpellier F-34095, France; celina.abi-khalil@umontpellier.fr (C.A.-K.); cljoven@gmail.com (C.L.-J.)

² Center for MARine Biodiversity, Exploitation and Conservation (MARBEC, UMR 9190), University of Montpellier, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Montpellier F-34095, France; eric.abadie@ifremer.fr (E.A.); mohamed.laabir@univ-montp2.fr (M.L.)

³ Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Phycotoxines Laboratory, l'Ile d'Yeu street BP 21105, Nantes Cedex 3 F-44311, France; veronique.savar@ifremer.fr (V.S.); zouher.amzil@ifremer.fr (Z.A.)

* Corresponding: jean.luc.rolland@ifremer.fr; Tel.: +33-467-144-709; Fax: +33-467-144-622

Abstract: The multifactorial etiology of massive *Crassostrea gigas* summer mortalities results from complex interactions between oysters, opportunistic pathogens and environmental factors. In a field survey conducted in 2014 in the Mediterranean Thau Lagoon (France), we evidenced that the development of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*, which produces paralytic shellfish toxins (PSTs), was concomitant with the accumulation of PSTs in oyster flesh and the occurrence of *C. gigas* mortalities. In order to investigate the possible role of toxic algae in this complex disease, we experimentally infected *C. gigas* oyster juveniles with *Vibrio tasmaniensis* strain LGP32, a strain associated with oyster summer mortalities, after oysters were exposed to *Alexandrium catenella*. Exposure of oysters to *A. catenella* significantly increased the susceptibility of oysters to *V. tasmaniensis* LGP32. On the contrary, exposure to the non-toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* or to the haptophyte *Tisochrysis lutea* used as a foraging alga did not increase susceptibility to *V. tasmaniensis* LGP32. This study shows for the first time that *A. catenella* increases the susceptibility of *Crassostrea gigas* to pathogenic vibrios. Therefore, in addition to complex environmental factors explaining the mass mortalities of bivalve mollusks, feeding on neurotoxic dinoflagellates should now be considered as an environmental factor that potentially increases the severity of oyster mortality events.

Keywords: harmful algae; environment; interaction; pathogens; defense; paralytic shellfish toxin

1. Introduction

The mortality of the juvenile pacific oyster *Crassostrea gigas* is the result of complex interactions between oysters, their environment and opportunistic pathogens. It is a global phenomenon that has been observed several times in marine systems of different countries, including Brazil, the USA [1,2] and recently reported in New Zealand, Australia and Europe [3–6]. In France, high *C. gigas* mortality rates (60%–100%) have been reported since 1991. They are of major concern to oyster farmers [7,8]

due to the important economic losses. Pathogenic populations of *Vibrio* from the Splendidus clade have been associated with the recurrent “summer mortality” outbreaks in *C. gigas* juveniles [9–13]. Among them is *Vibrio tasmaniensis* LGP32 [10], whose pathogenic processes have been characterized in detail [14–16]. The ostreid herpes virus OsHV-1 μ Var was also associated with abnormal mortalities of *C. gigas* in France [17,18]. It is believed that abiotic factors enhance the susceptibility of oysters to infections by various pathogens, such as bacteria and viruses [9,10,19]. Temperature was actually found to be one major driving environmental factor influencing oyster mortality [20]. However, when considered individually, pathogens, temperature, reproductive effort, diet and farming practices do not account for the global increase in oyster mortalities in recent years [20–23].

C. gigas oysters, like other bivalve mollusks, are filter feeders that feed on micro-phytoplankton, including toxic dinoflagellates. Among these dinoflagellates, *Alexandrium catenella*, a paralytic shellfish toxin (PST) producer, is observed worldwide [24]. Extensive blooms of this species have been reported in various marine environments, such as the Pacific Ocean of North America [25], Chile [26], New Zealand [27], Japan, China, South Korea [28,29] and the western Mediterranean Sea [30,31]. In the Mediterranean Sea, blooms of *A. catenella* were observed in confined areas, such as lagoons and harbors [32,33]. Since 1998, several *A. catenella* blooms were observed in spring and/or autumn in the Mediterranean Thau Lagoon (France, N 43°25', E 03°39'), a shallow lagoon open to the sea and holding an important oyster (*C. gigas*) production (10,000 tonnes·year^{−1}) [34–38]. In Thau Lagoon, *A. catenella* could reach high densities during bloom periods (3×10^6 – 14×10^6 cells·L^{−1}) with toxin contamination in bivalves frequently exceeding the sanitary threshold over which the bivalves are considered dangerous for consumption [39].

It is now established that exposure of mollusks to high concentrations of PST-producing dinoflagellates could negatively affect the feeding, burrowing and survival of these bivalves [40–43]. Paralytic shellfish toxin (PST) producers are known to negatively affect the physiological and cellular processes of oysters, such as filtration and digestion [44–47]. Feeding on these neurotoxic dinoflagellates leads to an accumulation and biotransformation of PSTs mainly in the digestive gland [48,49]. Interestingly, these potent toxic algae impact the oyster immune system and induce an increase of reactive oxygen species (ROS) production and an inhibition of hemocyte phagocytosis [50–52]. Importantly, Medhioub *et al.* (2013) showed that the PST-producing *A. catenella* induces apoptosis in *C. gigas* hemocytes [53]. More recently, it has been shown that exposure to a toxic strain of *A. catenella* modifies the host-pathogen interaction by reducing the prevalence of OsHV-1 μ var infection [54]. However, the effects of *A. catenella* on the susceptibility of juvenile oysters to the bacterial pathogens involved in the summer mortality disease have not been investigated to date.

Here, we conducted a field study to investigate the relationship between the dynamics of *A. catenella* in the water column, the bioaccumulation of PSTs in oyster flesh and their mortality in the Thau Lagoon. The detection of PSTs in the flesh of oysters during a mortality event prompted us to investigate the negative effects of toxic algae on oyster susceptibility to pathogenic vibrios. In agreement with our field observations, controlled experiments showed that an exposure of *C. gigas* to *A. catenella* significantly impacts the survival of these mollusks when further infected with the pathogenic *V. tasmaniensis* strain LGP32.

2. Results

2.1. Occurrence of an Oyster Mortality Event during a Toxic *Alexandrium catenella* in the Thau Lagoon

We monitored the dynamics of toxic algae in the Thau in 2014, when a massive mortality of oyster juveniles occurred in April and May, as recorded in the French Shellfish Observatory Network database (RESCO for Réseau d'observations conchyliques) (Figure 1A). The mortality event occurred when the seawater temperature was between 13 °C and 17 °C (Figure 1B). Interestingly, *A. catenella* cells were observed in the water column from the Thau Lagoon in April, May and June 2014 at concentrations of 18, 105 and 358 cells·L^{−1}, respectively, when the mortality event occurred (Figure 1C).

The identification of *A. catenella* DNA in April and May 2014 at concentrations corresponding to 256 and 230 cells·L⁻¹, respectively, was confirmed by qPCR amplification (Figure 1C).

In addition to the presence of *A. catenella* in the water column, PSP toxins were detected in the flesh of juvenile oyster cultured in the Thau Lagoon. Importantly, neosaxitoxin (Neo-STX) was detected at high rates (up to 460 µg/kg of oyster flesh) in March, April and May 2014 concomitantly with the detection of *A. catenella* in the environment (Figure 1D). Interestingly, when mortality occurred (April–May 2014), the PSP rates tended to decrease in surviving oysters with no more Neo-STX being detected in June 2014, at the end of the mortality event. After the mortality event, in June 2014, neo-STX was no longer detected in surviving oysters; only low rates of gonyautoxin 2 (GTX2) and decarbamoyl gonyautoxin (dc-GTX2) were detected.

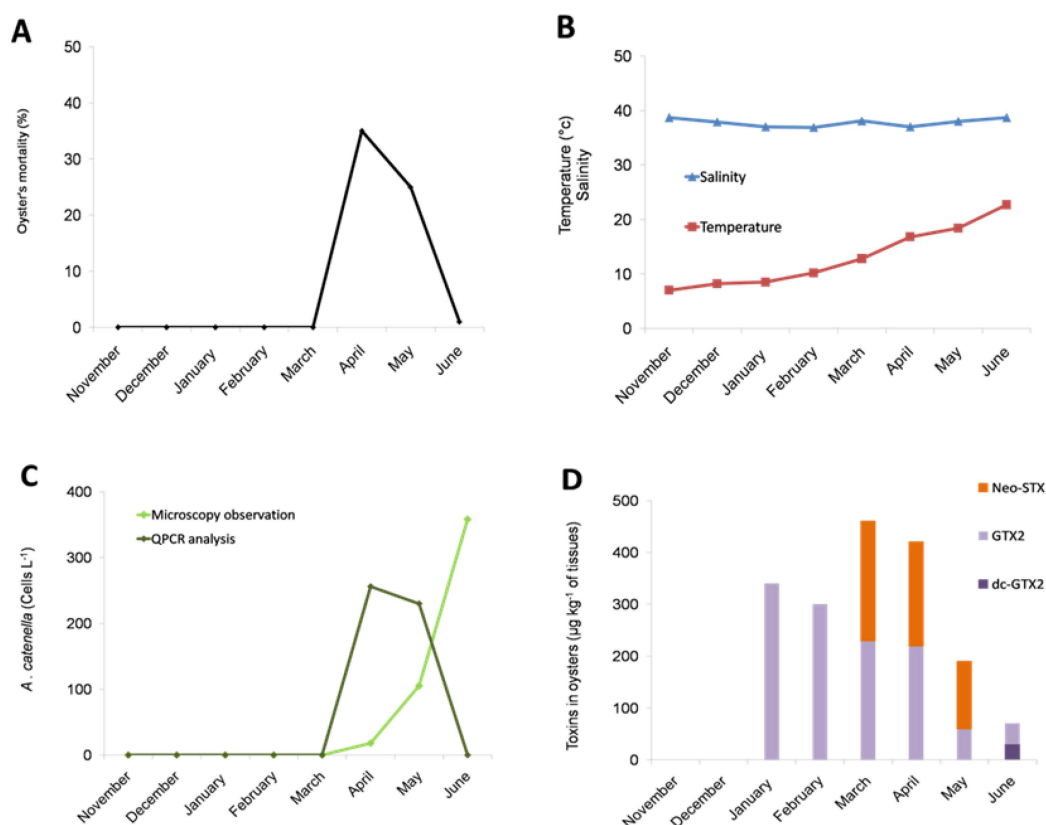


Figure 1. Field survey inside an oyster farm in Thau Lagoon in 2014. Oyster mortality (A); water temperature and salinity (B); abundance of *A. catenella* in water (C); accumulation of paralytic shellfish toxins in surviving oysters (D). The bar charts represent (in %) the temporal toxin in oysters. (Neo-STX for neosaxitoxin, GTX2 for gonyautoxin 2 and dc-GTX2 for decarbamoyl gonyautoxin 2).

2.2. Exposure to *Alexandrium catenella* Increases Oyster Mortality

To determine whether the presence of *Alexandrium catenella* could increase oyster mortality, juvenile oysters were exposed for 48 h either to the toxic strain of *A. catenella* (ACT03) or to *A. tamarense* (ATT07) or *T. lutea* used as foraging algae. Algal density was monitored in tanks all over the experiments showing similar concentrations in tanks during the time of experiment exposure (Figure S1). After a 24 h exposure to algae, oysters were injected with a lethal dose of *Vibrio tasmaniensis* LGP32 or sterile seawater (SSW), and oyster mortality was monitored for 10 days after their infection. We observed a significant increase in the mortality of oysters previously exposed to the toxic dinoflagellate *A. catenella* in comparison to individuals that were starved or exposed to *A. tamarense* or *T. lutea* ($p = 0.033$, 0.044 and 0.006 , Wilcoxon test, respectively) (Figure 2). The LD₃₀ (lethal dose 30%) was reached at Day 3 for animals previously fed with *A. catenella*, while it occurred at

Days 7, 6 and 9 for oysters starved, fed with *A. tamarense* or fed with *T. lutea*, respectively. In other words, at Day 10, the mortality of oysters that were previously exposed to *A. catenella* was 35%, 27% and 53% higher than that of oysters unfed or fed with *A. tamarense* or *T. lutea*, respectively. In the absence of infectious challenge, no mortalities were recorded over 10 days for control animals injected with sterile sea water (SSW), for starved oysters and for oysters fed with *A. catenella*, *A. tamarense* or *T. lutea*.

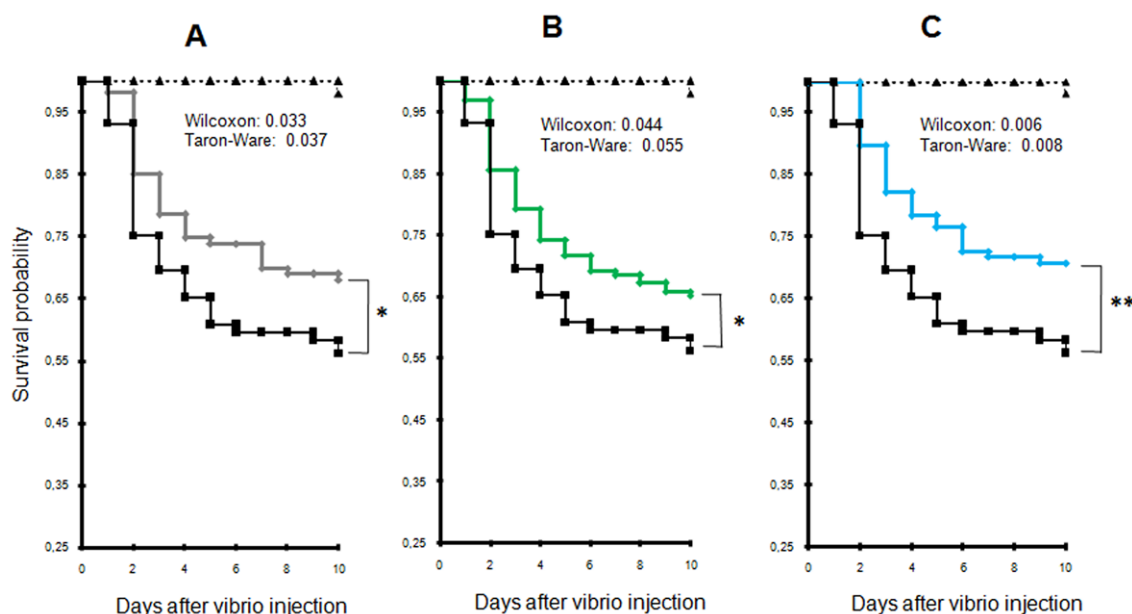


Figure 2. Comparison of Kaplan-Meier survival curves generated for oysters exposed to different algae and for starved mollusks. (A) Oysters fed *Alexandrium catenella* versus starved animals; (B) oysters fed *A. catenella* versus those fed *Alexandrium tamarense*; (C) oysters fed *A. catenella* versus those fed *Tisochrysis lutea*. *A. catenella* (black); *A. tamarense* (green); *T. lutea* (blue). Control oysters that were not infected by *Vibrio tasmaniensis* LGP32 or were injected with sterile seawater (SSW) are represented in black dashed triangles. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2.3. PSTs Accumulate in Infected Oysters

The *Alexandrium* sp. used in our experiment were controlled for their PST content. The ACT03 strain showed a toxin amount of 5.3 ± 0.4 pg toxins·cell^{−1}. The specific toxicity of this strain was 1 ± 0.1 pg STX equivalent·cell^{−1}. The ACT03 PST profile was characterized by the presence of carbamate, decarbamoyl and *N*-sulfocarbamoyltoxins. The following toxins were detected in decreasing concentrations: *N*-sulfocarbamoyltoxin 2 C2 (50%), GTX5 (35%), GTX4 (12%), GTX1 (1%) and Neo-STX (1%), with STX and dc-STX, GTX2, GTX3 and C4 present as trace amounts (Figure 3). No toxins were found in the *Alexandrium tamarense* strain (ATT07). In order to monitor the PST profile in oysters in our controlled experiment, dead oysters fed with *A. catenella* and infected with *V. tasmaniensis* were collected every day. PSTs were not detected in the most sensitive oysters, which died after one and two days of incubation. PSTs were detected in dead oysters after three days of incubation (Figure 3). Then, the toxicity level increased to reach 29 ± 7 µg·kg^{−1} tissue wet weight at Day 10. Moreover, the toxin profile displayed a substantial change in comparison to that of *A. catenella* cells (Figure 3). Among the toxins produced by *A. catenella*, only C2 was detected in oysters 10 days after the beginning of the experiment. GTX2, which was present as a trace in *A. catenella* cells, represented 100% of the total toxins measured in oysters that died at Days 3, 4, 5, 6 and 9 and was the major toxin compound (57%) at the end of the experiment (Day 10). Interestingly, the toxicity level reached 17 ± 5 µg·kg^{−1} tissue wet weight in oysters considered as survivors 12 days after the infection (Figure 3).

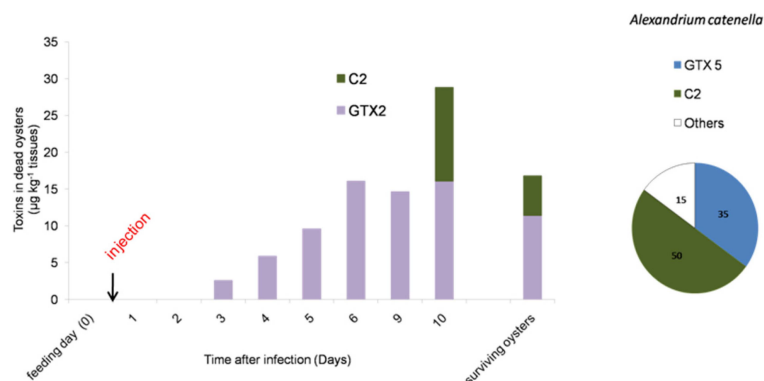


Figure 3. Evolution of the paralytic shellfish toxin content ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ wet weight of mollusk) in dead oysters during the *Vibrio tasmaniensis* LGP32 infection experiment. The bar charts represent (in %) the temporal toxin in oysters. The pie charts represent (in %) the toxin composition of *Alexandrium catenella*. (C2 for *N*-sulfocarbamoyltoxin 2, GTX2 for gonyautoxin 2 and GTX5 for gonyautoxin 5).

3. Discussion

Results from our laboratory experiments demonstrated that exposure to the neurotoxic *Alexandrium catenella* increases the susceptibility of *Crassostrea gigas* oysters to the pathogenic *V. tasmaniensis* LGP32. Indeed, a significant increase in oyster mortality induced by *Vibrio* infection was observed after exposure to *A. catenella*. Interestingly, we earlier showed that this toxic dinoflagellate induces the apoptosis of *C. gigas* hemocytes (immune cells) at PST concentrations similar to those generally observed *in situ* during a bloom of toxic algae [53]. Apoptosis was observed 24 h after exposure to *A. catenella*, which corresponds to the time we used for oyster infection in our experiment. Such destruction of the hemocytes, which play a key role in the defense mechanism of invertebrates [55], could strongly affect the capacity of *C. gigas* to resist bacterial infection and be responsible for the increased susceptibility of oysters observed here. Contrary to our results, exposure to *A. catenella* was shown to reduce the infection of oysters by the OsHV-1 herpesvirus [54]. The different susceptibility of oysters to those different pathogens is probably due to different immune reactions required to control bacterial and viral pathogens [56]. It can indeed be hypothesized that PSTs polarize the oyster immune response by triggering immune mechanisms that predispose to bacterial infections, but protect from viral infections. However, the potential lytic activity of the ACT03 strain towards hemocytes due to allelochemical compounds could not be ruled out and must be considered as an additional factor increasing the sensitivity of oysters to pathogens [57].

Supporting our hypothesis of a negative effect of toxic algae on oyster immunity, we observed an accumulation of toxins in the flesh of oyster batches showing higher mortality rates. Interestingly, no PSTs were found during the first and the second day of the incubation in the tissues of dead oysters that were fed with *A. catenella* and infected with *V. tasmaniensis*. GTX2, which was absent in the ACT03 cells, appeared in dead oysters three days after infection, and its concentration increased continuously until the 10th day of experimental exposure and during the *in situ* exposure. Data showed differences between toxins in the ingested *A. catenella* cells and those found in fed oysters. This could be attributed to a selective uptake of the toxins in oyster tissues, metabolic interconversion and elimination of the toxins [47,58–60]. Several studies suggested that an active biotransformation/interconversion of PSTs occurred [58,61]. The toxins that were accumulated in oysters in the experimental infection or in oyster individuals exposed *in situ* to natural *A. catenella* blooms can result from the transformation of some toxins (GTX3, C2 and others) produced by this dinoflagellate. This suggests that an important biotransformation process occurred in the *C. gigas* tissues. In our experiments, C2 and GTX2 accumulated in surviving oysters (Figure 3). We can speculate that these toxins, resulting from biotransformation, may have low toxicity and presumably did not affect the capacity of oysters to resist vibrio infection.

One important finding from this study is that *C. gigas* mortality observed in 2014 occurred while oyster flesh was contaminated by PSTs. These results correspond to previous works showing that PSTs were present at concentrations as high as $920 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ of digestive gland wet weight in oysters exposed to toxic algae in Thau Lagoon in May 2011 [62] when oyster mortality also occurred (April–May 2011 according to the French Shellfish Observatory Network). In the present study, toxins had been detected in oyster tissues since January 2014, while mortalities occurred only in April and May 2014. In agreement with our experimental data, this indicates that oyster intoxication by PSTs alone is not sufficient to induce mortalities, but could rather participate in the induction of oyster mortality in a multifactorial way that involves vibrios and likely other pathogens [13,63].

This study showed that *A. catenella* increases the susceptibility of *C. gigas* oysters to pathogenic *V. tasmaniensis*. To our knowledge, this is the first time that a direct link between a previous exposure of marine invertebrates to a paralytic shellfish toxin (PST) producer and the mortality induced by a pathogenic microorganism has been established. The interaction *A. catenella*/*C. gigas*/*Vibrio* was supported by the co-occurrence of oyster mortality and PST presence in oyster organs. The field observation suggested that *A. catenella* development *in situ* could trigger *C. gigas* mortality. Among the dinoflagellates producing PSTs, the genus *Alexandrium* is one of the major genera with respect to its diversity, magnitude and consequences on the ecosystem components [24]. Studies will provide further insight into the relationships between the established and emerging toxic dinoflagellates and mass mortalities of marine invertebrates. In particular the role of these algae in predisposing marine animals to microbes (bacteria and/or virus) occurring frequently in the environment should be the subject of further study. Other research focusing on direct interactions between toxins and bacteria would be required to better understand the mechanisms involved in these interactions. To conclude, in addition to complex environmental factors explaining mass mortalities of bivalve mollusks, feeding on toxic algae should now be considered a contributing factor.

4. Experimental Section

4.1. Field Survey in Thau Lagoon

4.1.1. Collection of Environmental Samples and Processing

Phytoplankton samples from Thau Lagoon (Languedoc-Roussillon, France) were collected each month from November 2013–June 2014 inside the oyster farm named Bouzigues (N $43^{\circ}26.058'$ and E $003^{\circ}39.878'$) (Figure 4). Sea water (duplicate) was collected from the sub-surface (-50 cm) using a pump. On the boat, 20–30 liters of water were concentrated through $20\text{-}\mu\text{m}$ pore filters to a final volume of 50 mL (fraction $>20 \mu\text{m}$). Total DNA from 1 mL of this fraction was extracted and purified according to the standard procedure of the current protocols in molecular biology, Unit 2.2.1 [64]. After purification, DNA was conserved in 100 μL of water at -20°C until PCR was performed.

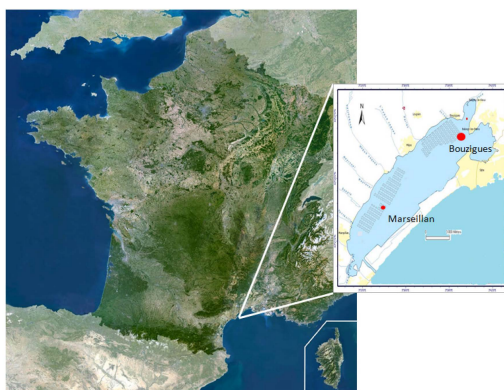


Figure 4. Map showing locations of the sampling stations in Thau Lagoon.

4.1.2. Dynamics of *Alexandrium catenella*

Species belonging to the *Alexandrium tamarense* complex are often difficult to separate. This complex is composed of three morphospecies, namely *A. fundyense* (Balech), *Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid) Balech and *A. tamarense* (Lebour) Balech. Taxa, such as *A. catenella* and *A. tamarense*, are considered as cryptic species [65]. Recently, John *et al.* [66] proposed to rename *A. catenella* (Whedon & Kofoid) Balech *Alexandrium pacificum* (Litaker). However, this proposition is still under debate [67]. In Thau Lagoon, Genovesi *et al.* [36] showed the simultaneous presence of the toxic *A. catenella* and the non-toxic *A. tamarense* [68] that belong to Group IV and Group III, respectively. By microscopic observation, *A. catenella* cannot be formally identified; molecular identification is therefore the most accurate method to identify this species accurately in a preserved natural samples.

From field-preserved Thau water samples, *Alexandrium catenella/tamarense* abundance (cells·L⁻¹) was determined using photonic microscopy counting. As specified above, based on the morphological characteristics, it was difficult to discriminate *A. catenella* from *A. tamarense* in the field samples. To specifically identify and quantify the presence of *A. catenella* in water, we performed a quantitative method using the primers FACAT28 and RACATAM269 from Genovesi *et al.* [36] that target specifically the 18S–28S rRNA ITS region of *A. catenella*. Briefly, PCR amplifications were performed in the Light Cycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). In short, the following components were mixed: 1 µM of each primer (3.33 µM) and 3 µL of reaction mix (Light Cycler® 480 SYBR® Green I Master mix, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in a final volume of 5 µL. DNA (1 µL) was added as the PCR template to the mix, and the following run protocol was used: initial denaturation at 95 °C for 5 min; 95 °C for 10 s; 58 °C for 10 s; 72 °C for 10 s. A subsequent melting temperature curve was performed between 65 °C and 97 °C with a heating rate of 0.11 °C/s, a continuous fluorescence measurement and a cooling step to 40 °C. Each PCR was performed in duplicate. To determine the qPCR efficiency, the standard curve was generated using five serial dilutions (1:1, 1:3, 1:7, 1:15, 1:31) of a DNA sample of the *A. catenella* ACT03 strain. Before quantitative PCR analysis, a significant linear relationship ($R^2 = 0.99$) was demonstrated between the cycle threshold (Ct) and the logarithm of the initial concentration of *A. catenella* ACT03 from 4 to 4000 cells·L⁻¹ (the detection limit). Moreover, the PCR product analysis on agarose gel and by melting curve revealed a unique lane (240 bp) and a unique peak (80 °C), respectively, indicating the formation of a single PCR product with no artifacts (data not shown).

4.1.3. Oyster Mortality

Oyster mortality was monitored in Thau Lagoon from November 2013–June 2014 by the French Shellfish Observatory Network [69]. Oysters were natural diploid *Crassostrea gigas* juveniles collected in 2012 and 2013 in the basin of Arcachon, France (initial average shell length ≤30 mm.). Oysters were placed inside an oyster farm, called Marseillan East (N 43°36.461' and E 003°55.394', Marseillan, Languedoc-Roussillon, France), that corresponds to a representative site of oyster mortalities that occur throughout the lagoon (Figure 4). In fact, mortalities were shown to affect different oyster farms within Thau Lagoon (in Marseillan and Bouzigues) identically in terms of kinetics and magnitude [23].

4.1.4. Oyster Biotxin Contamination

To monitor contamination by PSTs, juvenile oysters (Batch 2013.2) produced at the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) Hatchery in Bouin, France (initial average shell length 30 ± 0.4 mm), were immersed in Thau Lagoon at the oyster farm named Bouzigues (N 43°26.058' and E 003°39.878') in November 2013 (Figure 4). Five juvenile oysters were randomly collected each month from November 2013–June 2014. Pooled tissues of oysters were frozen at −20 °C until toxin extraction and subsequent analyzes were performed.

4.2. Experimental Infections

4.2.1. Oysters

Oysters used for experimental infections (Batches 2013.2 and 2014.2) were diploid *Crassostrea gigas* juveniles produced at the IFREMER Hatchery in Bouin, France (initial average shell length 30 ± 0.4 mm).

4.2.2. Algae Production

The experiments were carried out with a toxic strain of *Alexandrium catenella* (ACT03), a non-PST producing strain, *Alexandrium tamarense* (ATT07), and the haptophyte, *Tisochrysis lutea*, which is considered a foraging alga. ACT03 and ATT07 were isolated from Thau Lagoon in 2003 and 2007, respectively. Examination of the morphology of the studied strain ACT03 clearly showed the absence of the ventral pore between the plates 1' and 4' and the ability to form chains of up to eight cells during the exponential growth phase. This corresponds to the description of *Alexandrium catenella* (Whedon & Kof) Balech. In contrast, cells from the ATT07 culture showed clearly the presence of this previously-described ventral pore, and these are always observed in single or paired cells. Analysis of the nuclear rRNA fragment, including ITS1, the 5.8S rRNA gene, ITS2, and the D1/D2 28S rRNA genes revealed that the strain ACT03 belonged to the *A. catenella* species from Group IV (temperate Asian clade) and that the strain ATT07 belongs to *A. tamarense* (Group III) [36]. Dinoflagellates were grown at 20 °C under cool-white fluorescent illumination (100 μ moles photons/m²/s) in batch cultures, using a 12 h:12 h light:dark cycle. The enriched natural sea water (ENSW) culture medium was carried out following Harrison *et al.* [70] and was characterized by a salinity of 35. For the experiments, algae populations were in their exponential growth phase.

4.2.3. Pathogenic Bacterial Strain

Bacteria for infection were prepared as follows. A colony of *Vibrio tasmaniensis* LGP32 wild-type previously isolated on a Zobell media Petri dish was grown overnight at 20 °C in liquid medium under agitation (150 rpm). Cells were then washed three times with sterile seawater (SSW) by centrifugation (10 min, 1000 g, 20 °C).

4.2.4. Experimental Design

Two independent experimental exposures to *Alexandrium catenella* were carried out according to the protocol described by Rolland *et al.* [47]. Briefly, after 10 days of acclimatization without feeding, *Crassostrea gigas* juveniles were randomly placed into tanks (50 individuals per tank, 3 tanks per condition) containing 6 liters of filtered (0.2 μ m) seawater thermo-regulated at 22 °C. Then, oysters were subjected to different treatments, including exposure for 24 h to the toxic *A. catenella* and the non-toxic *Alexandrium tamarense* or *Tisochrysis lutea* at an initial concentration of 2×10^6 cells·L⁻¹, similar to the conditions observed during a natural bloom in Thau Lagoon [38]. Over the experiment, the algae concentration was maintained between 1×10^6 and 3×10^6 cells·L⁻¹ by adding algae to the sea water tanks. In control tanks, no algae were added. After a 24 h exposure, each batch of oysters received a 30% lethal dose (LD₃₀) of bacteria determined at Day 7. For that, each juvenile was injected with one dose of *V. tasmaniensis* LGP32 (50 μ L/animal; 2×10^8 and 1×10^9 for Batches 2013.2 and 2014.2, respectively) into its adductor muscle. Control oysters were injected with 50 μ L of sterile seawater (SSW). The mortality of juvenile oysters was monitored daily over 10 days (Figure 5). To determine the level of PST contamination of oysters, dead animals were collected each day for the duration of the experiment. Pooled tissues were frozen at -20 °C until the extraction of the toxin was carried out.

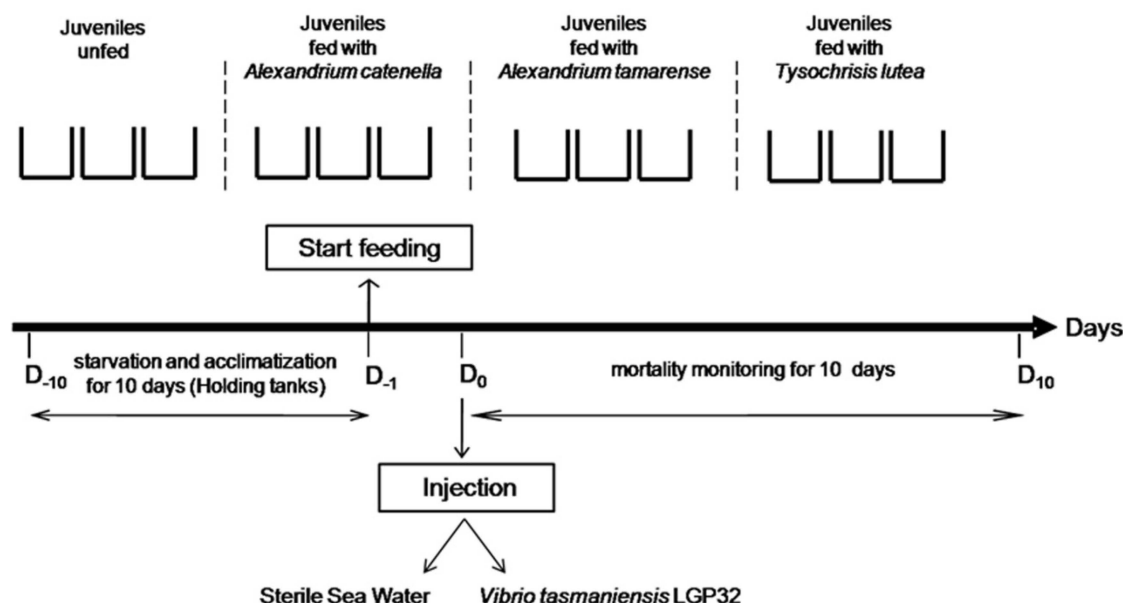


Figure 5. Laboratory experimental design.

4.3. Neurotoxins Analysis

To extract the PSTs, 5 mL of 0.1 N hydrochloric acid were added, and the samples were mixed with a high-speed homogenizer (15,000 rpm) for 2 min. The pH was adjusted between 2.0 and 4.0, then the samples were centrifuged at 4200 g for 10 min at 4 °C. The supernatants were filtered on 10-kDa polyethersulfone (PES) filters, and the toxin content was analyzed using the liquid chromatography with fluorescence detection (LC/FD) PSP toxin analyses method of Van De Riet [71]. The toxins GTXs, dc-GTXs, dc-STXs and STXs were separated using a reverse chromatography column (Zorbax Bonus RP, 3.5 μ M, 4.6 $\times$ 150 mm, Agilent Technologies, Massy, France) with a flow rate of 0.8 mL $\cdot$ min⁻¹. The eluent pH and/or column temperature were optimized to separate dc-GTX3/GTX5/dc-GTX-2 and C1/C2. The toxin concentrations were determined using certified standards provided by CNRC (Halifax, NS, Canada).

4.4. Statistical Analysis

The non-parametric Kaplan-Meier test was used to estimate Wilcoxon and Tarone-Ware values for comparing the experimental survival curves [72]. A confidence limit of 95% was used to test the significance of differences between groups. Data for the same experiment groups were pooled since there were no significant differences ($p > 0.05$). Values are the mean $\pm$ SD from two independent experiments * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Supplementary Materials: The following figure is available online at www.mdpi.com/2072-6651/8/1/24/s1. Figure S1. Variation of cell concentration in tanks during the experiments. *Alexandrium catenella* (blue); *Alexandrium tamarense* (red); *Tisochrysis lutea* (green).

Acknowledgments: We are grateful to Delphine Destoumieux-Garzon for critical reading of the manuscript and to Marc Leroy and Georges Rovillon for technical assistance. This work received financial support from the Ecosphère Continentale et Côtière (EC2CO) Microbien projects (Apotox 2012–2014 and Intervibrio 2013–2015). Thanks to the University of Montpellier (Ecole Doctorale GAIA: Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau) for funding Celina Abi-Khalil PhD and to IFREMER for the postdoctoral grant held by Carmen Lopez-Joven.

Author Contributions: M.L. and J.L.R. conceived of and designed the experiments. C.A.K., C.L.J., E.A. and J.L.R. performed the experiments. C.A.K. and J.L.R. analyzed the data. C.A.K., C.L.J., E.A., V.S. and Z.A. contributed reagents/materials/analysis tools. C.A.K., M.L. and J.L.R. wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sabry, R.C.; da Silva, P.M.; Gesteira, T.C.V.; Pontinha, V.D.; Magalhaes, A.R.M. Pathological study of oysters *Crassostrea gigas* from culture and *C. rhizophorae* from natural stock of Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Aquaculture* **2011**, *320*, 43–50. [[CrossRef](#)]
2. Burge, C.A.; Judah, L.R.; Conquest, L.L.; Griffin, F.J.; Cheney, D.P.; Suhrbier, A.; Vadopalas, B.; Olin, P.G.; Renault, T.; Friedman, C.S. Summer seed mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg grown in Tomales Bay, California, USA: The influence of oyster stock, planting time, pathogens, and environmental stressors. *J. Shellfish Res.* **2007**, *26*, 163–172. [[CrossRef](#)]
3. Nicolas, J.L.; Ansquer, D.; Cochard, J.C. Isolation and characterization of a pathogenic bacterium specific to Manila clam *Tapes-philippinarum* larvae. *Dis. Aquat. Org.* **1992**, *14*, 153–159. [[CrossRef](#)]
4. Jenkins, C.; Hick, P.; Gabor, M.; Spiers, Z.; Fell, S.A.; Gu, X.N.; Read, A.; Go, J.; Dove, M.; O'Connor, W.; *et al.* Identification and characterisation of an ostreid herpes virus-1 microvariant (OsHV-1 mu-var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Dis. Aquat. Org.* **2013**, *105*, 109–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Keeling, S.E.; Brosnahan, C.L.; Williams, R.; Gias, E.; Hannah, M.; Bueno, R.; McDonald, W.L.; Johnston, C. New Zealand juvenile oyster mortality associated with ostreid herpesvirus 1—An opportunistic longitudinal study. *Dis. Aquat. Org.* **2014**, *109*, 231–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Domeneghetti, S.; Varotto, L.; Civettini, M.; Rosani, U.; Stauder, M.; Pretto, T.; Pezzati, E.; Arcangeli, G.; Turolla, E.; Pallavicini, A.; *et al.* Mortality occurrence and pathogen detection in *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis* close-growing in shallow waters (Goro lagoon, Italy). *Fish Shellfish Immun.* **2014**, *41*, 37–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Soletchnik, P.; le Moine, O.; Faury, N.; Razet, D.; Geairon, P.; Goulletquer, P. Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oleron: Spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). *Aquat. Living Resour.* **1999**, *12*, 131–143. [[CrossRef](#)]
8. Berthelin, C.; Kellner, K.; Mathieu, M. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comp. Biochem. Physiol.* **2000**, *125*, 359–369. [[CrossRef](#)]
9. Garnier, M.; Labreuche, Y.; Garcia, C.; Robert, M.; Nicolas, J.L. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.* **2007**, *53*, 187–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Gay, M.; Renault, T.; Pons, A.M.; le Roux, F. Two vibrio splendidus related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: Taxonomy and host alterations. *Dis. Aquat. Org.* **2004**, *62*, 65–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Lacoste, A.; Jalabert, F.; Malham, S.; Cueff, A.; Gelebart, F.; Cordevant, C.; Lange, M.; Poulet, S.A. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis. Aquat. Org.* **2001**, *46*, 139–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Le Roux, F.; Binesse, J.; Saulnier, D.; Mazel, D. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene vsm by use of a novel counterselectable suicide vector. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 777–784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lemire, A.; Goudenege, D.; Versigny, T.; Petton, B.; Calteau, A.; Labreuche, Y.; le Roux, F. Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J.* **2015**, *9*, 1523–1531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Duperthuy, M.; Binesse, J.; le Roux, F.; Romestand, B.; Caro, A.; Got, P.; Givaudan, A.; Mazel, D.; Bachere, E.; Destoumieux-Garzon, D. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ. Microbiol.* **2010**, *12*, 951–963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Duperthuy, M.; Schmitt, P.; Garzon, E.; Caro, A.; Rosa, R.D.; le Roux, F.; Lautredou-Audouy, N.; Got, P.; Romestand, B.; de Lorgeteril, J.; *et al.* Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 2993–2998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vanhove, A.S.; Duperthuy, M.; Charriere, G.M.; le Roux, F.; Goudenege, D.; Gourbal, B.; Kieffer-Jaquinod, S.; Coute, Y.; Wai, S.N.; Destoumieux-Garzon, D. Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17*, 1152–1165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Segarra, A.; Pepin, J.F.; Arzul, I.; Morga, B.; Fauray, N.; Renault, T. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.* **2010**, *153*, 92–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Martenot, C.; Oden, E.; Travaille, E.; Malas, J.P.; Houssin, M. Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Res.* **2011**, *160*, 25–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Garcia, C.; Thebault, A.; Degremont, L.; Arzul, I.; Miossec, L.; Robert, M.; Chollet, B.; Francois, C.; Joly, J.P.; Ferrand, S.; *et al.* Ostreid herpes virus1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Vet. Res.* **2011**, *42*, 416–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Samain, J.F. Review and perspectives of physiological mechanisms underlying genetically-based resistance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to summer mortality. *Aquat. Living Resour.* **2011**, *24*, 227–236. [[CrossRef](#)]
21. Jolivel, A.; Elodie, F. Statistical Analysis of Oyster mortality data Acquired by the National Observatory shellfish. Available online: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00130/24095/> (accessed on 3 December 2015).
22. Pernet, F.; Barret, J.; le Gall, P.; Corporeau, C.; Degremont, L.; Lagarde, F.; Pepin, J.F.; Keck, N. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquac. Environ. Interact.* **2012**, *2*, 215–237. [[CrossRef](#)]
23. Pernet, F.; Lagarde, F.; Jeanne, N.; Daigle, G.; Barret, J.; le Gall, P.; Quere, C.; D'orbcastel, E.R. Spatial and Temporal Dynamics of Mass Mortalities in Oysters Is Influenced by Energetic Reserves and Food Quality. *PLoS ONE* **2014**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Anderson, D.M.; Alpermann, T.J.; Cembella, A.D.; Collos, Y.; Masseret, E.; Montresor, M. The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* **2012**, *14*, 10–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Scholin, C.A.; Herzog, M.; Sogin, M.; Anderson, D.M. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). Sequence analysis of LSU rRNA gene. *J. Phycol.* **1994**, *30*, 744–754. [[CrossRef](#)]
26. Córdova, J.L.; Müller, I. Use of PCR and partial sequencing of the large-subunit rRNA gene to identify *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) from the South of Chile. *Harmful Algae* **2002**, *1*, 343–350. [[CrossRef](#)]
27. MacKenzie, L.; de Salas, M.; Adamson, J.; Beuzenberg, V. The dinoflagellate genus *Alexandrium* (Halim) in New Zealand coastal waters: Comparative morphology, toxicity and molecular genetics. *Harmful Algae* **2004**, *3*, 71–92. [[CrossRef](#)]
28. Adachi, M.; Sako, Y.; Ishida, Y. Analyses of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. *J. Phycol.* **1996**, *32*, 424–432. [[CrossRef](#)]
29. Yeung, P.K.K.; Wong, F.T.W.; Wong, J.T.Y. Large subunit rDNA sequences from *Alexandrium catenella* strains isolated during algal blooms in Hong Kong. *J. Appl. Phycol.* **2002**, *14*, 147–150. [[CrossRef](#)]
30. Vila, M.; Garcés, E.; Maso, M.; Camp, J. Is the distribution of the toxic dinoflagellates *Alexandrium catenella* expanding along the NW Mediterranean coast? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2001**, *23*, 497–514. [[CrossRef](#)]
31. Penna, A.; Garcés, E.; Vila, M.; Giacobbe, M.G.; Fraga, S.; Luglie, A.; Bravo, I.; Bertozzini, E.; Vernesi, C. *Alexandrium catenella* (Dinophyceae), a toxic ribotype expanding in the NW Mediterranean sea. *Mar. Biol.* **2005**, *148*, 13–23. [[CrossRef](#)]
32. Garcés, E.; Maso, M.; Camp, J.A. Recurrent and localized dinoflagellate bloom in a Mediterranean beach. *J. Plankton Res.* **1999**, *21*, 2373–2391. [[CrossRef](#)]
33. Bravo, I.; Vila, M.; Maso, M.; Figueroa, R.I.; Ramilo, I. *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* blooms in the Mediterranean Sea: Toward the identification of ecological niches. *Harmful Algae* **2008**, *7*, 515–522. [[CrossRef](#)]
34. Abadie, E.; Amzil, Z.; Belin, C.; Comps, M.A.; Elzière-Papayanni, P.; Lassus, P.; le Bec, C.; Baut, C.M.-L.; Nezan, E.; Poggi, R. Contamination de l'étang de Thau par *Alexandrium tamarense*. Available online: <http://www.ifremer.fr/docelec/doc/1999/rapport-884.pdf> (accessed on 3 December 2015).
35. Lilly, E.L.; Kulis, D.M.; Gentien, P.; Anderson, D.M. Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: Evidence from DNA and toxin analysis. *J. Plankton Res.* **2002**, *24*, 443–452. [[CrossRef](#)]

36. Genovesi, B.; Shin-Grzebyk, M.S.; Grzebyk, D.; Laabir, M.; Gagnaire, P.A.; Vaquer, A.; Pastoureaud, A.; Lasserre, B.; Collos, Y.; Berrebi, P.; *et al.* Assessment of cryptic species diversity within blooms and cyst bank of the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae) in a Mediterranean lagoon facilitated by semi-multiplex PCR. *J. Plankton Res.* **2011**, *33*, 405–414. [[CrossRef](#)]
37. Laabir, M.; Amzil, Z.; Lassus, P.; Masseret, E.; Tapilatu, Y.; de Vargas, R.; Grzebyk, D. Viability, growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* **2007**, *20*, 51–57. [[CrossRef](#)]
38. Laabir, M.; Jauzein, C.; Genovesi, B.; Masseret, E.; Grzebyk, D.; Cecchi, P.; Vaquer, A.; Perrin, Y.; Colos, Y. Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *J. Plankton Res.* **2011**, *33*, 1550–1563. [[CrossRef](#)]
39. Masselin, P.; Amzil, Z.; Abadie, E.; Nézan, E.; le Bec, C.; Chiantella, C.; Truquet, P. Paralytic shellfish poisoning on the French Mediterranean coast in the autumn 1998: *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae) as causative agent. In *Harmful Algae Blooms*; Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J., Eds.; IOC-UNESCO: Paris, France, 2000; pp. 407–441.
40. Twarog, B.M.; Hidaka, T.; Yamaguchi, H. Resistance to tetrodotoxin and saxitoxin in nerves of bivalves mollusks: A possible correlation with paralytic shellfish poisoning. *Toxicon* **1972**, *10*, 273–278. [[CrossRef](#)]
41. Shumway, S.E.; Cucci, T.L. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behavior of bivalve molluscs. *Aquat. Toxicol.* **1987**, *10*, 9–27. [[CrossRef](#)]
42. Shumway, S.E. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *J. World. Aquac. Soc.* **1990**, *21*, 65–104. [[CrossRef](#)]
43. Bricelj, V.M.; Connell, L.; Konoki, K.; MacQuarrie, S.P.; Scheuer, T.; Catterall, W.A.; Trainer, V.L. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature* **2005**, *434*, 763–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bardouil, M.; Bohec, M.; Cormerais, M.; Bougrier, S.; Lassus, P. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.* **1993**, *1*, 417–422.
45. Wildish, D.; Lassus, P.; Martin, J.; Saulnier, A.; Bardouil, M. Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium* sp. on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* **1998**, *11*, 35–43. [[CrossRef](#)]
46. Lassus, P.; Baron, R.; Garen, P.; Truquet, P.; Masselin, P.; Bardouil, M.; Leguay, D.; Amzil, Z. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penze estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* **2004**, *17*, 207–214. [[CrossRef](#)]
47. Rolland, J.L.; Pelletier, K.; Masseret, E.; Rieuvilleneuve, F.; Savar, V.; Santini, A.; Amzil, Z.; Laabir, M. Paralytic toxins accumulation and tissue Expression of α -amylase and lipase genes in the pacific oyster *Crassostrea gigas* fed with the neurotoxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 2519–2534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Gueguen, M.; Bardouil, M.; Baron, R.; Lassus, P.; Truquet, P.; Massardier, J.; Amzil, Z. Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquat. Living Resour.* **2008**, *21*, 13–20. [[CrossRef](#)]
49. Medhioub, W.; Lassus, P.; Truquet, P.; Bardouil, M.; Amzil, Z.; Séchet, V.; Sibet, M.; Soudant, P. Physiological responses of *Crassostrea gigas* when exposed to the toxic dinoflagellates *Alexandrium ostenfeldii*: Toxin uptake and detoxification. *Aquaculture* **2012**, *358*, 108–115. [[CrossRef](#)]
50. Hegaret, H.; Wikfors, G.H.; Soudant, P.; Lambert, C.; Shumway, S.E.; Berard, J.B.; Lassus, P. Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effect on oyster hemocytes. *Mar. Biol.* **2007**, *152*, 441–447. [[CrossRef](#)]
51. Hegaret, H.; da Silva, P.M.; Wikfors, G.H.; Haberkorn, H.; Shumway, S.E.; Soudant, P. *In vitro* interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve mollusks. *Cell Biol. Toxicol.* **2011**, *27*, 249–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Mello, D.F.; da Silva, P.M.; Barracco, M.A.; Soudant, P.; Hegaret, H. Effects of the dinoflagellates *Alexandrium minutum* and its toxin (saxitoxin) on the functional activity and gene expression of *Crassostrea gigas* hemocytes. *Harmful Algae* **2013**, *26*, 45–51. [[CrossRef](#)]

53. Medhioub, W.; Ramondenc, S.; Vanhove, A.; Vergnes, A.; Masseret, E.; Savar, V.; Amzil, Z.; Laabir, M.; Rolland, J.L. Exposure to the Neurotoxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella* induces apoptosis of the oyster *Crassostrea gigas* hemocytes. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 4799–4814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lassudrie, M.; Soudant, P.; Nicolas, J.L.; Fabioux, C.; Lambert, C.; Miner, P.; le Grand, J.; Petton, B.; Hegaret, H. Interaction between toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* exposure and disease associated with herpesvirus OsHV-1 mu Var in Pacific oyster spat *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* **2015**, *45*, 53–61. [[CrossRef](#)]
55. Bachere, E.; Rosa, R.D.; Schmitt, P.; Poirier, A.C.; Merou, N.; Charriere, G.M.; Destoumieux-Garzon, D. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, *46*, 50–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Zhang, L.; Li, L.; Guo, X.; Litman, G.W.; Dishaw, L.J.; Zhang, G. Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Sci. Rep.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Fistarol, G.O.; Legrand, C.; Selander, E.; Hummert, C.; Stolte, W.; Graneli, E. Allelopathy in *Alexandrium* spp.: Effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquat. Microb. Ecol.* **2004**, *35*, 45–56. [[CrossRef](#)]
58. Oshima, Y. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. In *Harmful Marine Algal Blooms*; Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., Marcaillou, C., Eds.; Lavoisier/Intercept: Paris, France, 1995; pp. 475–480.
59. Suzuki, T.; Ichimi, K.; Oshima, Y.; Kamiyama, T. Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin profiles and short-term detoxification kinetics in mussels *Mytilus galloprovincialis* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae* **2003**, *2*, 201–206. [[CrossRef](#)]
60. Bougrier, S.; Lassus, P.; Bardouil, M.; Masselin, P.; Truquet, P. Paralytic shellfish poison accumulation yields and feeding time activity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and king scallop (*Pecten maximus*). *Aquat. Living Resour.* **2003**, *16*, 347–352. [[CrossRef](#)]
61. Cembella, A.D.; Shumway, S.E.; Larocque, R. Sequestering and putative biotransformation of paralytic shellfish toxins by the sea scallop *Placopecten magellanicus*: Seasonal and special scales in natural populations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2005**, *180*, 1–22. [[CrossRef](#)]
62. Rolland, J.L.; Medhioub, W.; Vergnes, A.; Abi-khalil, C.; Savar, V.; Abadie, E.; Masseret, E.; Amzil, Z.; Laabir, M. A feedback mechanism to control apoptosis occurs in the digestive gland of the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the paralytic shellfish toxins producer *Alexandrium catenella*. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 5035–5054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Petton, B.; Bruto, M.; James, A.; Labreuche, Y.; Alunno-Bruscia, M.; le Roux, F. *Crassostrea gigas* mortality in France: The usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Front. Microbiol.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. In *Current Protocol in Molecular Biology*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2003; Volume 1, pp. 2.2.1–2.2.3.
65. John, U.; Fensome, R.A.; Medlin, L.K. The application of a molecular clock based on molecular sequences and the fossil record to explain biogeographic distributions within the *Alexandrium tamarense* “species complex” (Dinophyceae). *Mol. Biolog. Evol.* **2003**, *20*, 1015–1027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. John, U.; Litaker, W.; Montresor, M.; Murray, S.; Brosnahan, M.L.; Anderson, D.M. Proposal to reject the name *Gonyaulux catenella* (*Alexandrium catenella*) (Dinophyceae). *Taxon* **2014**, *63*, 932–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Wang, L.; Zhuang, Y.; Zhang, H.; Lin, X.; Lin, S. DNA barcoding species in *Alexandrium tamarense* complex using ITS and proposing designation of five species. *Harmful Algae* **2014**, *31*, 100–113. [[CrossRef](#)]
68. Lilly, E.L.; Halanych, K.M.; Anderson, D.M. Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae). *J. Phycol.* **2007**, *43*, 1329–1338. [[CrossRef](#)]
69. Shellfish Observatory Network (RESCO). Ifremer, 155 rue Jean-Jacques Rousseau, 92138, Issy-les-Moulineaux, France. Available online: http://wwwz.ifremer.fr/observatoire_conchylicole (accessed on 3 December 2015).
70. Harrison, P.J.; Waters, R.E.; Taylor, F.J.R. A broad-spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* **1980**, *16*, 28–35. [[CrossRef](#)]

71. Van de Riet, J.; Gibbs, R.S.; Muggah, P.M.; Rourke, W.A.; MacNeil, J.D.; Quilliam, M.A. Liquid Chromatography Post-Column Oxidation (PCOX) Method for the Determination of Paralytic Shellfish Toxins in Mussels, Clams, Oysters, and Scallops: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* **2011**, *94*, 1154–1176. [[PubMed](#)]
72. Kaplan, E.L.; Meier, P. Non parametric estimation for incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* **1958**, *53*, 457–481. [[CrossRef](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Section B.

La toxine paralysante, la saxitoxine, entre dans le cytoplasme des cellules immunitaires de l'huître et induit leur mort selon une voie caspases-dependante

SECTION B

La toxine paralysante, la saxitoxine, entre dans le cytoplasme des cellules immunitaires de l'huître et induit leur mort selon une voie caspases-dépendante.

Dans de précédents travaux de l'équipe, il avait été montré que le dinoflagellé *Alexandrium catenella*, producteur des toxines paralysantes (PSTs), induisait l'apoptose des cellules immunitaires de l'huître *Crassostrea gigas*, les hémocytes (Figure 16). En revanche, l'exposition des huîtres à l'algue non toxique *A. tamarens* ne modifiait pas le nombre des hémocytes en apoptose (Medhioub et al., 2013).

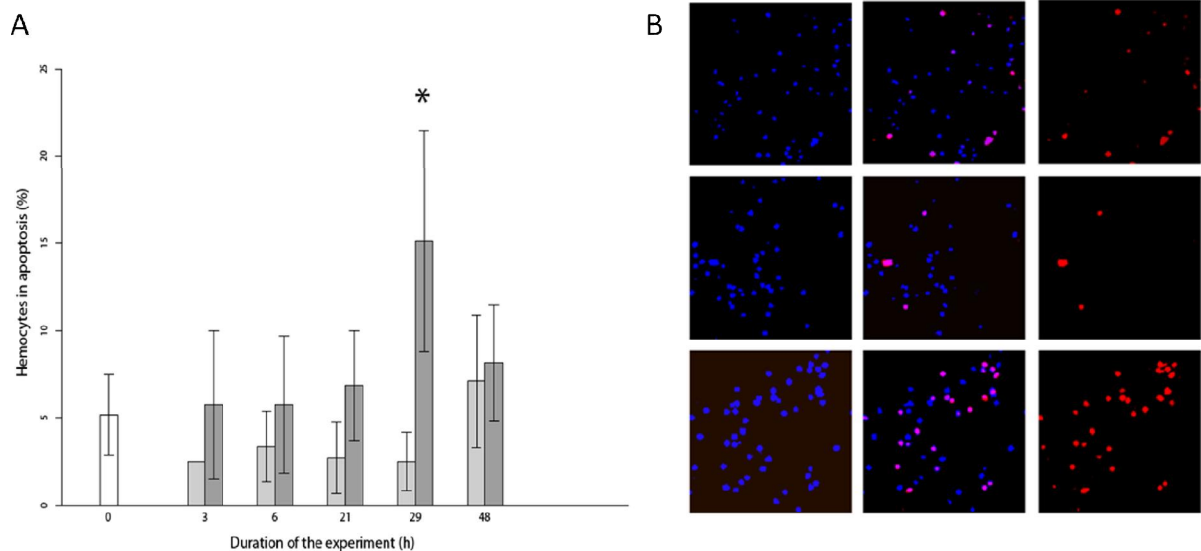


Figure 16. Evaluation du nombre des hémocytes en apoptose chez des huîtres exposées pendant 48h à *Alexandrium catenella*

(A) Pourcentage des cellules en apoptose. Huîtres non exposées (blanc), exposées à *Alexandrium tamarens* (gris) ou à *Alexandrium catenella* (gris foncé), * (ANOVA, $p < 0.01$).

(B) Observations microscopiques des hémocytes d'huîtres non exposées (a), exposées pendant 29h à *A. tamarens* (b) ou à *A. catenella* (c) après marquage TMRNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase TetraMethylRhodamine Nick End Labelling). Les noyaux sont marqués en bleu et les cellules apoptotiques en rouge. D'après (Medhioub et al., 2013).

Afin de voir si les PSTs produites par *A. catenella* sont responsables de l'apoptose observée lors de l'exposition de *C. gigas* à cette même microalgue, nous avons entrepris plusieurs études *in vitro* d'exposition des hémocytes de l'huître aux principaux PSTs produits par *A. catenella* : la saxitoxine (STX), la gonyautoxine 5 (GTX5) et les N-sulfocarbamoyltoxine 1 et 2 (C1C2). En nous appuyant sur des observations microscopiques, nous avons ainsi pu montrer que les hémocytes constituent une des cibles cellulaires de la STX chez *C. gigas*. Nous avons également comparé l'effet des différentes PSTs sur les cellules immunitaires des huîtres.

Par une approche cellulaire, nous avons d'abord démontré que la STX se lie à des structures granulaires présentes dans le cytoplasme des hémocytes de *C. gigas* et induit une mort hémocytaire qui est dépendante des caspases et caractérisée par une fragmentation de l'ADN. Cette mort a été observée en microscopie à épifluorescence après 3h30 et 24h de mise en contact des hémocytes d'huître avec la STX. Nous avons également démontré, grâce à un test d'oxydation du luminol, que cette mort hémocytaire était indépendante de la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS).

Enfin, nous avons démontré que le dérivé toxinique GTX5 était plus toxique sur les hémocytes de l'huître que STX et C1C2, respectivement, à la fois en microscopie à épifluorescence et en cytométrie de flux, après marquage de l'ADN fragmenté. La cytométrie en flux nous a également permis de mettre en évidence que parmi les populations hémocytaires touchées, les hyalinocytes étaient les plus sensibles au stress toxique induit par les PSTs.

En conclusion, cette étude a permis de démontrer pour la première fois que les toxines STX, GTX5 et C1C2 produites majoritairement par le dinoflagellé *Alexandrium catenella*, ciblent directement les hémocytes de *C. gigas* dont elles induisent une mort caspases-dépendante. Nous avons également montré que dans ce phénomène, le dérivé toxinique GTX5 était le plus toxique parmi les PSTs majoritaires d'*A. catenella*.

Publication 2 :

Les résultats de ces travaux sont présentés dans la publication 2 :

Celina Abi-Khalil, Darren Finkelstein, Genevieve Conejero, Justin Du Bois, Delphine Destoumieux-Garzon, Jean-Luc Rolland. **The Paralytic Shellfish Toxin, Saxitoxin, enters the cytoplasm and induces caspase-dependent death of oyster immune cells.** (En préparation)

The Paralytic Shellfish Toxin, Saxitoxin, enters the cytoplasm and induces caspase-dependent death of oyster immune cells.

Celina Abi-Khalil¹, Darren Finkelstein², Genevieve Conejero³, Justin Du Bois², Delphine Destoumieux-Garzon¹ and Jean-Luc Rolland^{1,*}

¹. IFREMER, CNRS, Université de Montpellier, Université de Perpignan Via Domitia, IHPE, UMR 5244, F-34095 Montpellier, France. E-Mails: celina.abi-khalil@umontpellier.fr (C.A.K.); ddestoum@ifremer.fr (D.D.G.); jean.luc.rolland@ifremer.fr (J.L.R.)

². Department of Chemistry, Stanford University, Stanford, California 94305, United States. E-Mails: darren.finkelstein@stanford.edu (D.F.) justin.dubois@stanford.edu (J.D.)

³. Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux, INRA-SupAgro, 2 Place Viala, 34060 Montpellier, France. granier@supagro.inra.fr. E-Mail: genevieve.conejero@supagro.inra.fr (G.C.)

* Author to whom corresponding should be addressed; E-Mail: jean.luc.rolland@ifremer.fr; Tel.: +33-467-144-709.

Abstract:

Paralytic Shellfish Toxins (PSTs) are neurotoxins synthesized by dinoflagellates of the genus *Alexandrium*, including *A. catenella*, and are responsible of the Paralytic Shellfish Poisoning disease in humans after the ingestion of contaminated shellfish. In bivalves, PST-producers can negatively affect the physiological and immunological parameters. In this study, we evaluated the effect of the major PSTs produced by *A. catenella*, saxitoxin (STX), gonyautoxin 5 (GTX5) and the *N*-sulfocarbamoyltoxin 1 and 2 (C1C2), on *Crassostrea gigas* immune cells, the hemocytes. DNA breaks were measured after Terminal deoxynucleotidyl transferase TetraMethylRhodamine Nick End Labelling (TMRNEL) staining using both flow cytometry and fluorescence microscopy assays. *In vitro* exposure to PSTs showed that STX targets granular structures present in the cytoplasm of *C. gigas* hemocytes and induces their caspase-dependent death while no Reactive Oxygen Species (ROS) production was stimulated. Besides, Exposure to different concentration of PSTs showed that GTX5 was more toxic than STX and C1C2 to oyster hemocytes. Moreover, flow cytometry analysis showed that hyalinocyte cells were the most susceptible to this toxic stress. These results demonstrate that PSTs are sufficient to induce hemocyte cell death and can therefore negatively affect the defense of bivalve mollusks because of the central role of hemocytes in oyster defense.

Keywords: Immune cells; Paralytic Shellfish Toxins; saxitoxin; cell death; caspase-dependent pathway.

1. Introduction

Saxitoxin (STX) and its structurally related analogs referred to as Paralytic Shellfish Toxins (PSTs) are potent neurotoxins that are naturally produced in both freshwater and marine environments by cyanobacteria and dinoflagellates of the genus *Alexandrium*, *Gymnodinium* and *Pyrodinium* (Oshima 1995 ; Landsberg et al. 2006). These toxins are composed of more than 57 tetrahydropurines and can be divided into four categories: the carbamate toxins, which include Saxitoxin (STX); the *N*-sulfocarbamoyl toxins; the decarbamoyl toxins and the deoxydecarbamoyl toxins (Cembella 1998). STX and its analogs are water-soluble, acid stable and thermostable (Wiese et al. 2010). They are produced in large quantities during massive episodic dinoflagellate proliferation known as Harmful Algal Blooms (HABs) (Gainey et al. 1988).

In vertebrates, STX was shown to block neuronal transmission by binding to the voltage-gated Na⁺ channel of nerve and muscle cells (Kao 1972; Narahashi 1972; Cestele and Catterall 2000). STX also binds to potassium and calcium channels (Wang et al. 2003) and several other proteins, such as copper transporters (Cusick et al. 2012) or Saxiphilin, an iron-binding protein (Morabito et al. 1995; Llewellyn and Moczydlowski 1994). Thus, consumption of seafood contaminated by algal toxins results in a variety of gastro-intestinal and neurologic symptoms known as Paralytic Shellfish Poisoning syndromes which can lead, in extreme cases, to human death (Landsberg et al. 2006).

In oysters, feeding on neurotoxic dinoflagellates leads to an accumulation and biotransformation of PSTs mainly in the digestive gland (Gueguen et al. 2008). Toxic algae can negatively affect the physiological processes of oysters, such as filtration, digestion and feeding capacity (Shumway 1990; Lassus et al. 2004; Rolland et al. 2012). Negative effects of toxic algae have also been reported on oyster immune cell parameters. These include inhibition of cell adhesion and phagocytosis (Hegaret et al. 2011). More recently, neurotoxic *Alexandrium catenella*, but not the non-toxic *Alexandrium tamarense*, was shown to induce apoptosis of the immune cells of *Crassostrea gigas*, the hemocytes, (Medhioub et al. 2013) and to increase the susceptibility of the oyster to pathogenic vibrios (Abi-Khalil et al. 2016).

Hemocytes, which include three populations of blast-like cells, hyalinocytes and granulocytes, are oyster circulating blood cells (Bachere et al. 2015). Playing a key role in the maintenance of homeostasis, they are the cellular mediators of immune responses, involved in all steps of the immune response, from microbe recognition to pathogen elimination mainly through phagocytosis or encapsulation (Escoubas et al. 2016). Still, a series of bacteria and protozoans pathogenic for oysters resist hemocyte killing and have adopted intracellular stages (Duperthuy et al. 2011; Alavi et al. 2009). Hemocytes can then control infections by inducing cell death programs. Thus, apoptosis plays an important role in mollusk immunity (Sokolova 2009). More generally, it is an important mechanism directed to respond to microbial infection in invertebrates (Sokolova 2009; Terahara and Takahashi 2008; Hughes et al. 2010; Zhang et al. 2011). Hemocytes from bivalve mollusks also respond to infection and damage by additional cell death processes such as the recently described ETosis, which leads to the extracellular release of antimicrobial DNA traps (Poirier et al. 2014; Robb et al. 2014).

Whereas filtration of toxic algae by oysters was shown to alter hemocyte functions and impair oyster defense against facultative intracellular vibrios (Medhioub et al. 2013; Abi-Khalil et al. 2016), it is still unknown if those negative effects result directly from the PSTs themselves. Surprisingly, while cellular and molecular interactions of STX and analogs with vertebrate cells have been the subject of numerous studies, little attention has been paid to PST cellular targets in marine invertebrates, in particular in bivalves.

Here we asked whether PSTs, produced by *Alexandrium catenella*, can be responsible for the apoptosis of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed to toxic algae. To determine whether hemocytes were a cellular target for PSTs, we conducted *in vitro* experiments in which oyster hemocytes were exposed to coumarin-coupled to STX and monitored STX cellular localization by multiphoton microscopy. We also measured the PST-induced ROS production and DNA fragmentation of hemocyte populations. Finally, we characterized STX-induced cell damages by electron microscopy. Our results show that STX accumulates in oyster hemocytes and induces cell death through the caspase-dependent pathway. Unlike in vertebrates, gonyautoxin-5 (GTX5) was found to be more toxic to oyster hemocytes than STX and *N*-sulfocarbamoyl-1-2 (C1C2).

Among hemocyte populations, hyalinocytes were shown to be more susceptible to STX-induced cell death than blast-like cells.

2. Materials and Methods

2.1. STX and analogs

Saxitoxin coupled to coumarin dye (STX-Cou) and Guanine coupled to coumarin dye (Cou-Gua) were synthesized, HPLC purified, and stored in the dark as a lyophilized powder at -20°C. Cou-Gua is a coumarin dye containing a short alkyl linker with water solubilizing guanidine moiety on the other end. The coumarin dye in Cou-Gua is exactly the same as in STX-Cou. The absorbance and fluorescence emission spectra of both coupled-coumarin dyes are 406 nm and 471 nm, respectively.

The saxitoxin (STX), gonyautoxin 5 (GTX5) and the *N*-sulfocarbamoyltoxin 1 and 2 (C1C2) were purchased from the CNRC, Canada.

2.2. STX detection by Multiphoton Microscopy

Hemocytes were freshly withdrawn from adult diploid oysters and were kept on ice before plating on 13-mm glass slides in 4-well culture plates at a cell density of 5×10^5 cells/well. After one hour of incubation at 20°C, cells attached to glass slides were incubated with sterile sea water (SSW, control) or SSW containing 1µM of either STX coupled to coumarin dye (STX-Cou) or Guanine coupled to coumarin dye (Cou-Gua). After 3h30 of incubation at 20°C, mitochondria were stained with 300 nM of Mitotracker Red (Molecular probes) for 30 min in a dark room. After three washes with PBS buffer, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized for 10 min with 0.01% Triton X-100. After three washes with PBS buffer, cells were stained for 10 min with 1.25 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and fixed with fluorescent mounting medium (DAKO). Cells were observed and images captured using a Zeiss LSM 780 NLO Multi-photon Confocal Microscope (inverse). Reference spectra emissions of DAPI, STX-Cou, and Mitotracker Red were also recorded (800 nm excitation, emission from 365 to 700 nm, lambda mode on spectral channel) and saved in spectra database (ZEN software, Zeiss). Linear unmix with the 3 references spectra was then applied on non-exposed hemocytes or on hemocytes exposed to STX-Cou or to Cou-Gua.

2.3. Transmission electron microscopy

Hemolymph withdrawn from the oyster adductor muscle was kept on ice before incubating hemocytes in 1.5 ml tube and incubated them for 3h30 in SSW containing 0.8 μ M STX, SSW (negative control) or SSW containing 50 μ M Etoposide used as an inducer of apoptosis. After centrifugation (5 min, 600 g, 20 °C), the cells were fixed for 1 hour in SSW containing 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde. Fixation was achieved in 1% osmium tetroxide for 1 hour at room temperature in the dark. Excess fixing agents were eliminated during dehydration of samples in a graded series of aqueous solution containing increasing amounts of ethanol finishing by absolute acetone. Finally, dehydrated samples were embedded in epoxy resin (EmBed 812). Sections (70 nm thick) were stained with uranyl acetate. All preparations were examined under a Hitachi 7100 transmission electron microscope.

2.4. Monitoring of PST-induced DNA breaks on hemocytes

2.4.1. By fluorescence microscopy

Hemocytes previously attached to glass slides were incubated with SSW (control) or SSW containing 0.008 μ M, 0.08 μ M or 0.8 μ M STX (CNRC, Canada) +/- 100 μ M of Z-VAD-FMK (Promega). Additional assays were performed with 0.008 μ M, 0.08 μ M or 0.8 μ M C1C2 or GTX5 (CNRC, Canada) or 50 μ M of Etoposide. After 3h30 and 24h of incubation at 20°C, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized with 0.01% Triton X-100 for 10 min. After three washes with PBS, the early stages of apoptosis was detected by the TetraMethyl Rhodamine nick end labeling (TMRNEL) assay using the *In Situ* Cell Death Detection Kit (TMR red, Roche®). Briefly, incubation with TMR red was performed for 60 min at 37 °C in the dark according to the manufacturer's recommendations. After three washes with PBS, cell nuclei were stained for 10 min with 1.25 μ g/ml DAPI (Sigma) then mounted in fluorescent mounting medium (DAKO). For every condition, 30 images were taken randomly over the entire surface of the glass slide (covering a thousand hemocytes) using a 40 x objective on a Zeiss Axio Imager upright fluorescence microscope equipped with an AxioCamMRm 2 digital microscope camera. To get higher imaging resolution of the cells, microscopy was performed using a Leica TCS SPE confocal scanning laser microscope (with 40x or 63x objectives). The image files were then analyzed using FIJI software. On each picture, the numbers of DAPI- and TMRNEL-labeled cell nuclei were determined. The percentage of cells showing DNA breaks was determined by

dividing the number of TMRNEL-labeled cells (red nuclear) by the number of DAPI-labeled cells (blue nuclear).

2.4.2. By flow cytometry

Hemocytes previously attached to glass slides were incubated for 3h30 in SSW (control) or SSW containing 50 μ M of Etoposide or 0.08 μ M of STX, C1C2 or GTX5. Hemocytes were treated with trypsin 0.2%-EDTA 0.4% for 30 min. Detached cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 1 hour in Eppendorf tubes and centrifuged for 10 min at 1000g (20°C). Hemocyte pellets were resuspended in PBS, centrifuged for 5 min at 600 g and permeabilized with 0.01% Triton X-100 for 10 min. After PBS washing and centrifugation (5min, 600g, 20°C), hemocytes were labeled with TMRNEL and DAPI as before. Hemocytes (10 000 per sample) were gated by size and granularity (blue) (Bachere et al. 2015) and the percentage of TMRNEL-labeled cells (red) per population was determined using a BD LSR Fortessa[®] flow cytometer analyzer.

2.5. Luminescent monitoring of Reactive Oxygen Species production

Hemocytes freshly withdrawn from oyster adductor muscle were plated on a black 96-well plate with transparent flat bottom at 5×10^5 cells/well. After 1 h of incubation at 20 °C, the hemocytes were washed with SSW and incubated for 1 h with 1 mM luminol sodium salt (Sigma) diluted in sterile seawater (SSW). Then, zymosan particles (at a multiplicity of infection of 50:1) or STX at a concentration of 0.8 μ M were quickly added and the plate was immediately placed into a microplate reader infinite M200 (Tecan) to quantify the luminescence emission every 2 min for 2 h (integration time 1500 ms). Results are expressed in Relative luminescence Units (RLUs) indicative of luminal oxidation.

2.6. Statistical Analyses

All statistical analyses were performed using GraphPadPrism software. Data were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a *post hoc* Tukey HSD. Values are the median $\pm$ SD from duplicate per condition and from three independent experiments. Differences were considered significant when $p < 0.001$, represented with a, b, c, d, e superscripts.

3. Results

3.1. Saxitoxin (STX) targets the cytoplasm of oyster hemocytes but not the mitochondria

The cellular interaction of STX with hemocytes was investigated by multiphoton microscopy using STX coupled to coumarin (STX-Cou). A fluorescent labelling matching with the fluorescence spectra of coumarin (Figure 1A) was observed in the cytoplasmic space of oyster hemocytes (Figure 1C). STX-Cou appeared to be localized in small cytoplasmic granules of the hemocytes. No fluorescence was observed on hemocytes incubated with the control coumarin Cou-Gua, indicating the STX-specific interaction with hemocytes (Figure S1). In addition, no subcellular co-localization was observed between STX-Cou and the Mitotraker dye used to reveal mitochondria (Figure 1). Taken together, these results showed that the STX targets the cytoplasm of *C. gigas* hemocytes but not their mitochondria.

3.2. STX induces a caspase-dependent cell death of oyster hemocytes

To determine whether STX can induce apoptosis, hemocytes of *C. gigas* were exposed to 0.8 μ M of STX for 3h30 and 24h. In three independent experiments, TMRNEL labeling revealed a significant increase in the number of hemocytes with fragmented nuclear DNA as indicated by a high number of red fluorescent nuclei in STX-exposed hemocytes only (Figure 2A). Indeed, after 3h30 of exposure to STX, we observed $54.8 \pm 2.7\%$ TMRNEL-positive hemocytes, as counted by fluorescence microscopy ranged (Figure 2B, $p < 0.001$). In contrast, only $15.5 \pm 3\%$ hemocytes were TMRNEL-positive in non-treated controls kept for 3h30 in identical culture conditions. No significant variation was observed between 3h30 and 24h of exposure (Figure 2B, $p < 0.001$).

To determine whether the observed DNA fragmentation was dependent on caspases, we repeated the experiment by adding 100 μ M Z-VAD-FMK, a cell-permeable pan-caspase inhibitor, to STX-exposed hemocytes. We also used Etoposide, an inducer of apoptosis as a positive control. TMRNEL-positive cells were counted after a 3h30 exposure.

In three independent experiments, Z-VAD-FMK significantly inhibited the fragmentation of nuclear DNA induced by STX. Indeed, a dramatic drop in TMRNEL-positive cells was observed, from $51.1 \pm 1.6\%$ to $3.6 \pm 0.5\%$ in the presence of Z-VAD-FMK ($p < 0.001$) (Figure 3). In non-treated hemocytes (controls), the percentage of TMRNEL-positive cells stayed at 8.1 ± 1.3

% (Figure 3). In hemocytes exposed to Etoposide, the percentage of TMRNEL positive cells was up to $76.8 \pm 1.6\%$ (Figure 3).

3.3. Hemocytes exposed to STX show higher levels of chromatin condensation

To characterize the ultrastructural features considered as the hallmark of apoptosis, transmission electron microscopy was performed on hemocytes exposed for 3h30 to $0.8 \mu\text{M}$ of STX. Surprisingly, results showed no nuclear condensation, normal morphological appearance of cytoplasmic organelles, and intact plasma membranes in cells treated or not with STX (data not shown). Nevertheless, hemocytes treated with STX and Etoposide showed a similar phenomenon of chromatin condensation at the nuclear periphery, which was only rarely observed in non-treated controls (Figure S3).

3.4. Saxitoxin does not induce Reactive Oxygen Species (ROS) production

Since ROS are known to initiate a series of cell death processes characterized in mollusks, including apoptosis and ETosis, we measured the production of ROS in STX-treated hemocytes over 2 hours and compared it to ROS production in hemocytes exposed to zymosan, which induces a strong oxidative burst in oyster hemocytes (Poirier et al. 2014). In contrast to zymosan, which induced ROS production in the first minutes of exposure, STX did not induce any detectable ROS production in hemocytes over the time course, suggesting that the STX-induced death of *C. gigas* hemocytes does not depend on ROS production (Figure 4).

3.5. GTX5 is more toxic than STX and C1C2 to oyster hemocytes

To compare the toxicity level of the Saxitoxin (STX) and its major analogs produced by *Alexandrium catenella* on oyster hemocytes, hemocytes were exposed for 3h30 to increasing concentrations of STX, GTX5 and C1C2. In three independent experiments, the number of TMRNEL-positive cells increased in a dose-dependent manner for every PST tested (Figure 5). At $0.008 \mu\text{M}$, PSTs did not induce any detectable cell death. On the contrary, at $0.8 \mu\text{M}$, all of them induced $48.8 \pm 1.3\%$ - $51.4 \pm 1.7\%$ hemocyte deaths without any significant difference between PSTs (Figure 5). Interestingly, at $0.08 \mu\text{M}$ level, we observed significant differences between PSTs (Figure 5, $p < 0.001$). The higher level of TMRNEL-positive cells was detected for hemocytes exposed to GTX5 ($46.7 \pm 0.6\%$). STX and C1C2 were the less toxic inducing only

32.8±0.2 and 13.6±0.6% cell death, respectively (Figure 5). Altogether, these data showed that the three tested PSTs induce a dose-dependent apoptosis of oyster hemocytes and that GTX5 is more toxic than STX and C1C2 on *C. gigas* hemocytes.

3.6. Hyalinocytes are more susceptible to PSTs than blast-like cells

To investigate the effects of PSTs on the different hemocyte populations, flow cytometry analysis was performed on hemocytes exposed to 0.08 μ M PSTs, as this concentration proved to discriminate the toxicity of PSTs. Again, controls included non-treated and Etoposide-treated hemocytes. After 3h30, all cells were stained with TMRNEL and DAPI. Only blast-cells and hyalinocytes could be analyzed by flow cytometry as in our experimental setup, which includes a step of cell adhesion, non-adherent granulocytes were lost. In accordance with our fluorescence microscopy observations, a significant increase in dead cells was measured in PST-challenged hemocytes compared to non-treated controls. Hyalinocytes were more susceptible than blast-like cells to both PSTs and Etoposide as indicated by the measurement of different cell characteristics combined such as fluorescence, size, and granularity (Figure 6). For instance, STX induced 73.6% TMRNEL-positive cells in hyalinocytes as opposed to 34.4 % in blast-like cells. We confirmed GTX5 was overall more toxic than STX than C1C2 (Figure 6). Interestingly, whereas we observed little difference between PSTs on hyalinocytes (66.5-76.5% TMRNEL-positive cells), an important contrast was observed on blast-like cells, from 25.9% to 47.9% TMRNEL-positive cells for C1C2 and GTX5, respectively. Altogether, these data showed (i) that hyalinocyte cells are more susceptible to PSTs than blast-like cells and (ii) that the contrast observed in the toxicity of PSTs is largely due to their activity on blast-like cells.

4. Discussion

Results showed that Saxitoxin (STX) and its GTX5 and C1C2 analogs produced by the dinoflagellate *Alexandrium catenella* induce a significant and dose-dependent caspase-dependent cell death of oyster hemocytes *in vitro*. This is to our knowledge the first evidence of a direct effect of paralytic shellfish toxins (PSTs) on bivalve immune cells. Indeed, a number of *in vitro* and *in vivo* studies have shown that exposure to PST-producers increases hemocyte mortality (Hegaret et al. 2011; Lassudrie et al. 2016). In particular, we and others have recently shown the

apoptotic effects on hemocytes of the PST-producers *A. catenella* (Medhioub et al. 2013) and *Gymnodinium catenatum* (Estrada et al. 2014), which also produces GTX5, C1 and C2 as major toxins. For the first time in the present paper, we show that isolated PSTs are sufficient to induce hemocyte cell death. Like PSTs, a series of physical or chemical stressors can directly induce cell death in mollusk hemocytes. Among others, cadmium induces *in vitro* apoptosis of hemocytes in *Crassostrea virginica* through a mitochondria/caspase-independent pathway (Sokolova et al. 2004). Similarly, UVs induce apoptosis in hemocytes of *Ostrea edulis* (Gervais et al. 2015).

The caspase-dependent cell death induced by STX and analogs is reminiscent of apoptosis although it does not exhibit all typical features of this phenomenon. We indeed found that PSTs induce a massive caspase-dependent fragmentation of nuclear DNA at concentrations as low as 0.08 μ M (Figures 3 & 5). To distinguish apoptosis from pyroptosis (Kroemer et al. 2009; Galluzzi et al. 2012), which is also caspase-dependent; we used a series of molecular and cellular characterization. We first observed the ultrastructure of hemocyte after 3h30 exposure to 0.8 μ M STX, a concentration at which ~55% of the cells are positive to DNA nicked end labeling. Morphological observation of PST-treated hemocytes by TEM showed numerous events of chromatin condensation similar to those observed with Etoposide, a well-known inducer of apoptosis (Figure S3). However, typical features of apoptotic cells were not observed. We neither observed any sign of cell wall disruption, preventing us from distinguishing apoptosis from pyroptosis on that basis. It has to be mentioned that up to now, the ultrastructure of apoptosis and pyroptosis has been poorly explored in mollusks. Therefore, the PST-induced caspase-dependent cell death is likely related to apoptosis. This is consistent with our previous *in vivo* results in which the executor caspases 3 and 7, were both shown to be upregulated when apoptosis of the hemocytes of *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium catenella* occurred (Medhioub et al. 2013). On the contrary, caspase-1, which is involved in pyroptosis, was not induced (Medhioub et al. 2013). Altogether, this strongly suggests (i) that STX induces apoptosis in *C. gigas* hemocytes through a caspase-dependent pathway; and (ii) that the apoptotic effects of PST-producers are triggered by the toxins themselves.

One important finding from this study is that STX directly binds to hemocytes, as shown here by multiphoton microscopy (Figure 1). We also found that triggering of cell death was independent of ROS production. Indeed, in conditions inducing ~55% cell death, hemocytes exposed to STX did not show any increased luminol oxidation (Figure 4). This observation is consistent with previous studies showing that exposure to the PST-producer *A. minutum* and its purified STX induces a decrease in ROS production in *C. gigas* hemocytes (Hegaret et al. 2011; Mello et al. 2013). Altogether, this suggests that the STX-induced death of hemocytes may result from a direct interaction with a hemocyte ligand/receptor rather than a response to oxidative stress. From our multiphoton microscopy experiments, STX targets granular structures in the cytoplasm of oyster hemocytes (Figure 1). The mitochondria or the nucleus membrane were negative to STX staining (Figure 1). Up to now, molecular targets of STX have only been described in vertebrates. Although STX was mainly described to bind voltage-gate sodium channel present in the membrane of vertebrate nerve and muscle cells (Kao 1972; Narahashi 1972), STX was also been shown to bind to sodium channels located in cytoplasmic organelles of Schwann cells (Ritchie et al. 1990). Similarly, from our study, STX appears to bind to uncharacterized molecular targets present in the cytoplasmic organelles of oyster hemocytes.

Both hyalinocytes and blast-like cells exposed to PSTs showed significant DNA fragmentation (Figure 6). However, as culture conditions rely on a hemocyte adhesion step, we could not investigate the potential effects of PSTs on granulocytes. The PST-induced cell death may have important consequences on oyster defense and explain the detrimental effects of toxic algae on resistance to vibriosis (Abi-Khalil et al. 2016). Indeed, hemocytes play a key role in oyster immune response. They are involved in a series of cellular immune reactions, such as phagocytosis of invading microorganisms, formation of nodules and capsules surrounding pathogens and their subsequent degradation through the release of host defense molecules (Bachere et al. 2015). Moreover, circulating hemocytes are able to migrate from the hemolymph to connective tissues and promote localized responses following injury or microorganism invasion. Thus, enhanced apoptosis in hemocytes, induced by STX, has the potential to generate an immunosuppressed organism with reduced capacity to resist pathological insults and opportunistic infections. From our present study, we can hypothesize that a reduction of the

capacity of oysters exposed to *A. catenella* to resist vibrio infection (Abi-Khalil et al. 2016), could result from the PST-induced cell death of hemocytes.

One interesting finding was that hyalinocytes, which are key cellular effectors of the integrin-dependent phagocytosis (Terahara et al. 2006), were more susceptible to the PST-induced cell death than blast-like cells, independently of the PST used (Figure 6). Indeed, at only 0.08 μ M PSTs, the percentage of hyalinocytes with fragmented nuclear DNA reached 66.6 to 76.5% depending on PSTs, as shown by flow cytometry (Figure 6). In contrast, percentages of blast-like cells with fragmented nuclear DNA varied from 25.9 to 47.5%. Interestingly, the same major effect on hyalinocytes was observed with Etoposide, which affected 88.7% of the population. Thus, oyster hyalinocytes appear to be highly responsive to caspase-dependent cell death programs. Bachère et al. hypothesized that these non-granular cells corresponded to the same cell line observed at different stages of maturation and activity, in which blast-like cells were the smallest and the youngest (Bachere et al. 2004). One hypothesis that could explain the lower susceptibility of blast-like cells to PST-induced cell death is that PST ligands may be less expressed in young blast cells than in mature hyalinocytes.

Surprisingly, among the major PSTs produced by *A. catenella*, GTX5 induced the strongest toxic effect on oyster hemocytes (Figure 5). This is in contrast with the known PST toxicity on human cells where STX is described the most toxic compound (Cembella 1998). Our flow cytometry assay showed that the higher toxicity of GTX5 over STX and C1C2 is largely due to its higher toxicity on blast-like cells (Figure 6). Indeed, at the same low concentration (0.08 μ M), GTX5 has the potential to induce major lethal damages in at least two populations of hemocytes (47.5% of blast-like cells and 76.5% of hyalinocytes), whereas C1C2 was much less active against blast-like cells (25.9%). The high toxicity of GTX5 against oyster hemocytes is an important result as we earlier showed that this toxin, which is dominant in *A. catenella*, is almost absent from oysters fed on this algae. Instead, the oysters present a PST pattern rich in GTX2 and C2 (Abi-Khalil et al. 2016). This strongly suggests that a bioconversion of GTX5 occurs in oyster tissues in a detoxification process that contributes to oyster protection against a PST-induced hemocyte death and subsequent immune suppression related.

In conclusion, we showed in the present paper that PSTs are sufficient to induce hemocyte cell death and are therefore likely responsible for the induction of hemocyte apoptosis earlier observed for oysters hemocytes exposed to PST-producing algae. We indeed showed that STX binds granular structures present in the cytoplasm of *Crassostrea gigas* hemocytes and induce a caspase-dependent death of hemocytes that does not depend on ROS production. Hyalinocytes were found to be a hemocyte population highly responsive to this toxic stress. Moreover, GTX5, which is present in large amounts in *A. catenella* was the most toxic PSTs against oyster hemocytes. Because of the central role of hemocyte in oyster defense, their PST-induced death could negatively affect the defense of bivalve mollusks and explain the decreased resistance to vibrio infection of oysters exposed to GTX5-producing *A. catenella*.

Figure legends

Figure 1. Saxitoxin targets the cytoplasm of *C. gigas* hemocytes but not the mitochondria.

(A) Reference spectra emissions of DAPI (blue), Mitotracker Red (red) and Coumarin (green) were recorded using a multiphoton microscope (800 nm excitation, emission from 365 to 700 nm, 63x objective, lambda mode on spectral channel) and saved in spectra database (ZEN software, Zeiss). (B) Spectrum of non-exposed hemocytes, (C) spectrum of hemocytes exposed 3h30 to STX-Cou (Nuclei are stained in blue, mitochondria in red and STX in Green). Scale bar: 10 μ m.

Figure 2. Saxitoxin induces DNA Breakage in *C. gigas* hemocytes.

(A) Representative images of STX-induced DNA break in hemocytes after 3h30 of *in vitro* exposure. The images were acquired on a confocal microscope (x63) after Terminal deoxynucleotidyl transferase TetraMethylRhodamine Nick End Labelling (TMRNEL) and DAPI staining (total nuclei are stained in blue and nuclei with DNA breaks in red). Scale bar: 10 μ m (B) Percentage of DAPI-TMRNEL-positive cells in non-exposed hemocytes (white column) or in hemocytes exposed to 0.8 μ M of STX for 3h30 and 24h (dark grey column). Bars represent the mean $\pm$ standard errors from three independent experiments. Different superscripts (a and b) indicate statistically-significant differences ($p < 0.001$; two way anova/ Tukey HSD).

Figure 3. Saxitoxin induces the caspase-dependent cell death of *C. gigas* hemocytes.

Percentage of DAPI-TMRNEL-positive cells in non-exposed hemocytes (white column) or in hemocytes exposed for 3h30 to 50 μ M of Etoposide (black column) or to 0.8 μ M of either STX alone (grey column) or STX supplemented with 100 μ M of Z-VAD-FMK (dashed grey column). Bars represent the mean $\pm$ standard errors from three independent experiments. Different superscripts (a, b and c) indicate statistically-significant differences ($p < 0.001$; two way anova/ Tukey HSD).

Figure 4. Exposure of *C. gigas* hemocytes to Saxitoxin doesn't induce ROS production.

ROS production was monitored *in vitro* for 2h in non-exposed control hemocytes (dashed grey line), after stimulation with 0.8 μ M of saxitoxin (grey line) and after stimulation with zymosan at a multiplicity of infection of 50: 1 (black line). RLUs: Relative Luminescence Units of luminol oxidation.

Figure 5. GTX5 is more toxic than STX and C1C2 to oyster hemocytes.

Percentage of DAPI-TMRNEL-positive cells in non-exposed hemocytes (white column) or in hemocytes exposed for 3h30 to 0.008 μ M, 0.08 μ M, or 0.8 μ M of C1C2 (light grey column), STX (grey column), or GTX5 (dark grey column). Bars represent the mean $\pm$ standard errors from three independent experiments. Different superscripts (a, b, c, d and e) indicate statistically-significant differences ($p < 0.001$; two way anova/ Tukey HSD).

Figure 6. Hyalinocytes are more susceptible to PSTs than blast-like cells.

Percentage of DAPI-TMRNEL-positive cells of untreated hemocytes (blue histogram) or hemocytes treated for 3h30 with 50 μ M of Etoposide as a positive control (red line) or with 0.08 μ M of either GTX5 (orange line), STX (green line) or C1C2 (blue line), after flow cytometry analysis. 10 000 cells of each condition were sorted and DAPI-TMRNEL-positive cell hemocyte populations identified by flow cytometry using BD LSRFortessa[®] cell analyzer. TMRNEL staining was analyzed on DAPI-positive hemocytes only.

Supplementary figures

Figure S1. Coumarin does not bind to *C. gigas* hemocytes.

Localization of Coumarin coupled to Guanine (Cou-Gua) or Coumarin coupled to Saxitoxin (STX-Cou) in hemocytes by spectral analysis. Linear unmix with the 2 reference spectra of Mitotracker Red (red) and Coumarin (green) was applied on hemocytes exposed *in vitro* for 3h30 to Cou-Gua (A, B and C) or to STX-Cou (D, E and F). Images were acquired using a multiphoton microscope (800 nm excitation, emission from 365 to 700 nm, 63x objective, lambda mode on spectral channel). C and F are the merge of the two channels. Scale bar: 10 μ m.

Figure S2. Representative images of hemocytes exposed *in vitro* for 3h30 to different PSTs.

Pictures were obtained on non-exposed hemocytes or hemocytes exposed *in vitro* for 3h30 to 0.8 μ M of STX, GTX5 or C1C2. The images were acquired on a confocal microscope (A: x40 and B: x63) after DAPI (blue) and TMRNEL (red) staining. Scale bar: 20 μ m (A) and 10 μ m (B).

Figure S3. Representative images of transmission electron microscopy of STX-induced cell damages.

Pictures were obtained on non-exposed hemocytes (A) or hemocytes exposed *in vitro* for 3h30 to 50 μ M of Etoposide (B) or 0.8 μ M of STX (C). Similar cell condensation patterns are observed in Etoposide and STX-treated cells (white arrows). Scale bar: 1 μ m.

Acknowledgments: We are grateful to Dr. Guillaume Charrière, Dr. Evelyne Bachère and Prof. Stephen Baghdiguian on critical advice in cell biology. We are also grateful to Chantal Cazevieille for her help in TEM experiments. This work received financial support from the Ecosphère Continentale et Côtière (EC2CO) Microbien projects (Apotox 2012–2014). Celina Abi-khalil PhD was the recipient of a PhD grant from the University of Montpellier (Ecole Doctorale GAIA: Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau).

Author Contributions: C.A.K., D.D.G and J.L.R. conceived and designed the experiments. C.A.K. and J.L.R. performed the experiments. C.A.K., D.D.G and J.L.R. analyzed the data. G.C., J.D. and D.F. contributed reagents/materials/analysis tools. C.A.K., D.D.G. and J.L.R. wrote the paper.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Oshima Y. 1995 Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. : Lavoisier Publishine ILP (ed) .Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou-Le baut, C.
- Landsberg JH, Hall S, Johannessen JN, White KD, Conrad SM, Abbott JP, et al. 2006. Saxitoxin puffer fish poisoning in the United States, with the first report of *Pyrodinium bahamense* as the putative toxin source. *Environmental health perspectives* 114(10): 1502-1507.
- Cembella AD. 1998. Ecophysiology and metabolism of paralytic shellfish Toxins in marine microalgae. In: *Physiological ecology of harmful algal blooms*, (Anderson D.M. CADHGM, ed). Berlin, Heidelberg:Springer-Verlag, 381-403.
- Wiese M, D'Agostino PM, Mihali TK, Moffitt MC, Neilan BA. 2010. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Marine drugs* 8(7): 2185-2211.
- Gainey L, Shumway J, Shumway S. 1988 A compendium of the responses of bivalve molluscs to toxic dinoflagellates. *J Shellfish Res* 7: 623-628.
- Kao CY. 1972. Pharmacology of tetrodotoxin and saxitoxin. *Federation proceedings* 31(3): 1117-1123.
- Narahashi T. 1972. Mechanism of action of tetrodotoxin and saxitoxin on excitable membranes. *Federation proceedings* 31(3): 1124-1132.
- Cestele S, Catterall WA. 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82(9-10): 883-892.
- Wang J, Salata JJ, Bennett PB. 2003. Saxitoxin is a gating modifier of HERG K⁺ channels. *The Journal of general physiology* 121(6): 583-598.
- Cusick KD, Minkin SC, Dodani SC, Chang CJ, Wilhelm SW, Sayler GS. 2012. Inhibition of copper uptake in yeast reveals the copper transporter Ctr1p as a potential molecular target of saxitoxin. *Environmental science & technology* 46(5): 2959-2966.
- Morabito MA, Llewellyn LE, Moczydlowski EG. 1995. Correction: Molecular Cloning of Bullfrog Saxiphilin: A Unique Relative of the Transferrin Family that Binds Saxitoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(14): 6651-6651.
- Llewellyn LE, Moczydlowski EG. 1994. Characterization of saxitoxin binding to saxiphilin, a relative of the transferrin family that displays pH-dependent ligand binding. *Biochemistry* 33(40): 12312-12322.

- Gueguen M, Bardouil M, Baron R, Lassus P, Truquet P, Massardier J, et al. 2008. Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquatic Living Resources* 21(1): 13-20.
- Shumway SE. 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *J World Aquac Soc* 21: 65-104.
- Lassus P, Baron R, Garen P, Truquet P, Masselin P, Bardouil M, et al. 2004. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penze estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 17(2): 207-214.
- Rolland JL, Pelletier K, Masseret E, Rieuvilleneuve F, Savar V, Santini A, et al. 2012. Paralytic Toxins Accumulation and Tissue Expression of alpha-Amylase and Lipase Genes in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Fed with the Neurotoxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Marine drugs* 10(11): 2519-2534.
- Hegaret H, da Silva PM, Wikfors GH, Haberkorn H, Shumway SE, Soudant P. 2011. In vitro interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve molluscs. *Cell Biol Toxicol* 27(4): 249-266.
- Medhioub W, Ramondenc S, Vanhove AS, Vergnes A, Masseret E, Savar V, et al. 2013. Exposure to the Neurotoxic Dinoflagellate, *Alexandrium catenella*, Induces Apoptosis of the Hemocytes of the Oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine drugs* 11(12): 4799-4814.
- Abi-Khalil C, Lopez-Joven C, Abadie E, Savar V, Amzil Z, Laabir M, et al. 2016. Exposure to the Paralytic Shellfish Toxin Producer *Alexandrium catenella* Increases the Susceptibility of the Oyster *Crassostrea gigas* to Pathogenic *Vibrios*. *Toxins* 8(1).
- Bachere E, Rosa RD, Schmitt P, Poirier AC, Merou N, Charriere GM, et al. 2015. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. *Fish Shellfish Immunol* 46(1): 50-64.
- Escoubas JM, Gourbal B, Duval D, Green TJ, Charrière GM, Destoumieux-Garzón D, et al. 2016. Immunity in Molluscs. In: *Encyclopedia of Immunobiology*, Vol. 1, (Ratcliffe MJH, ed). Oxford: Academic Press, 417-436
- Duperthuy M, Schmitt P, Garzon E, Caro A, Rosa RD, Le Roux F, et al. 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(7): 2993-2998.
- Alavi MR, Fernandez-Robledo JA, Vasta GR. 2009. Development of an in vitro assay to examine intracellular survival of *Perkinsus marinus* trophozoites upon phagocytosis by oyster (*Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis*) hemocytes. *The Journal of parasitology* 95(4): 900-907.

- Sokolova IM. 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. *Isj-Invertebrate Survival Journal* 6(1): 49-58.
- Terahara K, Takahashi KG. 2008. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. *Current pharmaceutical design* 14(2): 131-137.
- Hughes FM, Foster B, Grewal S, Sokolova IM. 2010. Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus*. *Fish Shellfish Immunol* 29(2): 247-257.
- Zhang L, Li L, Zhang G. 2011. Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Developmental and comparative immunology* 35(5): 603-610.
- Poirier AC, Schmitt P, Rosa RD, Vanhove AS, Kieffer-Jaquinod S, Rubio TP, et al. 2014. Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas*. *The Journal of biological chemistry* 289(36): 24821-24831.
- Robb CT, Dyrynda EA, Gray RD, Rossi AG, Smith VJ. 2014. Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon. *Nature communications* 5: 4627.
- Lassudrie M, Soudant P, Nicolas JL, Miner P, Le Grand J, Lambert C, et al. 2016. Exposure to the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* modulates juvenile oyster *Crassostrea gigas* hemocyte variables subjected to different biotic conditions. *Fish Shellfish Immunol* 51: 104-115.
- Estrada N, Ascencio F, Shoshani L, Contreras RG. 2014. Apoptosis of hemocytes from lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* induced with paralyzing shellfish poison from *Gymnodinium catenatum*. *Immunobiology* 219(12): 964-974.
- Sokolova IM, Evans S, Hughes FM. 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *The Journal of experimental biology* 207(Pt 19): 3369-3380.
- Gervais O, Renault T, Arzul I. 2015. Induction of apoptosis by UV in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol* 46(2): 232-242.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16(1): 3-11.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19(1): 107-120.

Mello DF, da Silva PM, Barracco MA, Soudant P, Hegaret H. 2013. Effects of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* and its toxin (saxitoxin) on the functional activity and gene expression of *Crassostrea gigas* hemocytes. *Harmful Algae* 26: 45-51.

Ritchie JM, Black JA, Waxman SG, Angelides KJ. 1990. Sodium channels in the cytoplasm of Schwann cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(23): 9290-9294.

Terahara K, Takahashi KG, Nakamura A, Osada M, Yoda M, Hiroi T, et al. 2006. Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster "*Crassostrea gigas*". *Developmental and comparative immunology* 30(8): 667-683.

Bachere E, Gueguen Y, Gonzalez M, de Lorgeril J, Garnier J, Romestand B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews* 198: 149-168.

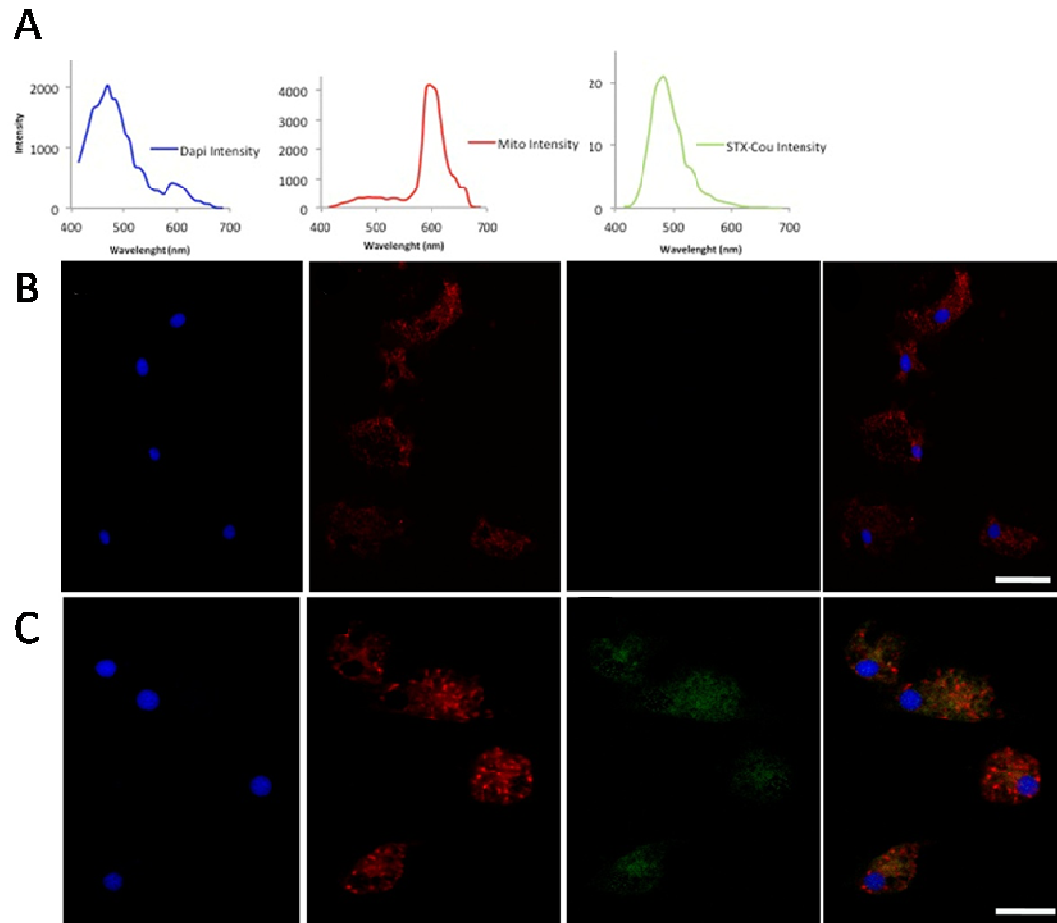


Figure 1. Saxitoxin targets the cytoplasm of *C. gigas* hemocytes but not the mitochondria.

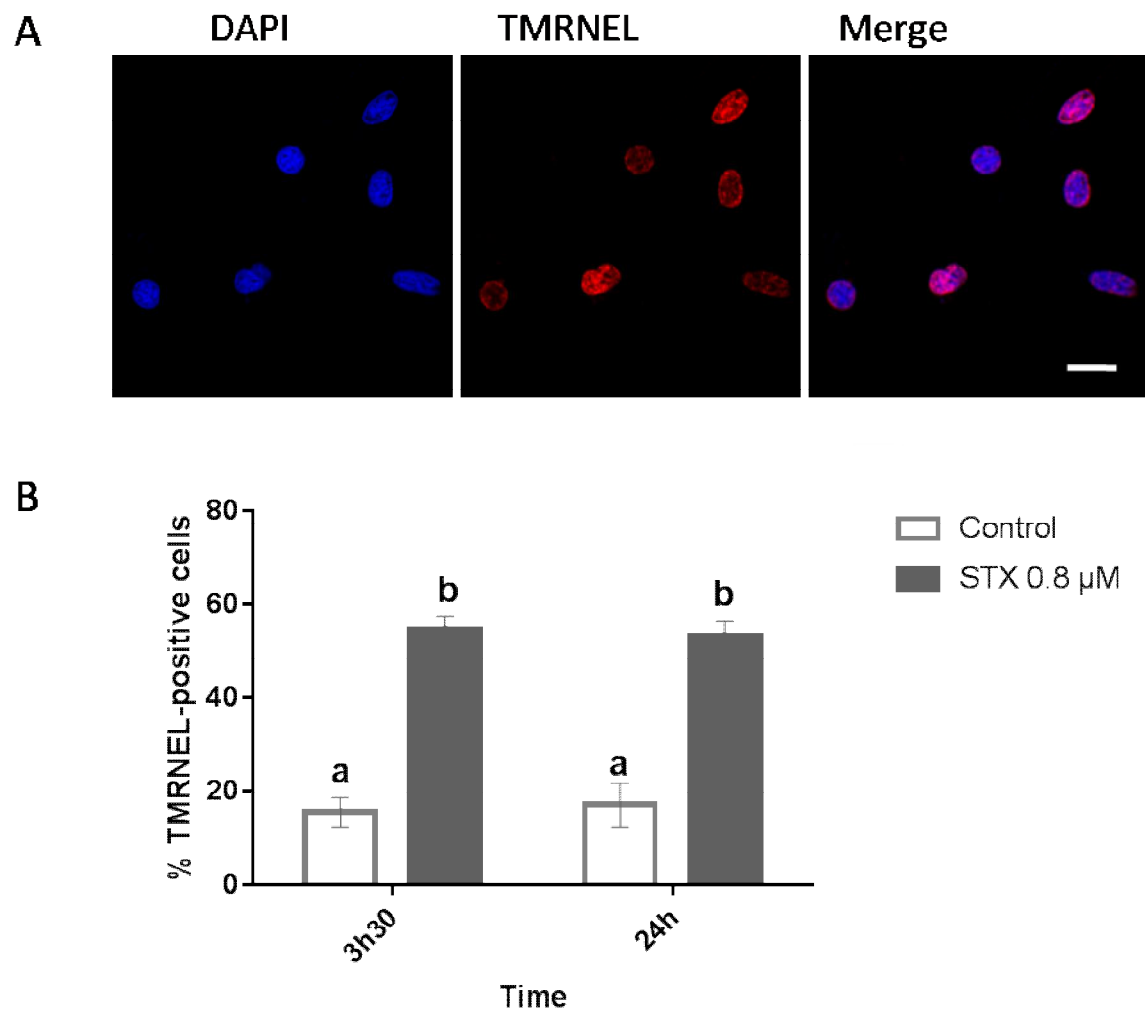


Figure 2. Saxitoxin induces DNA Breakage in *C. gigas* hemocytes.

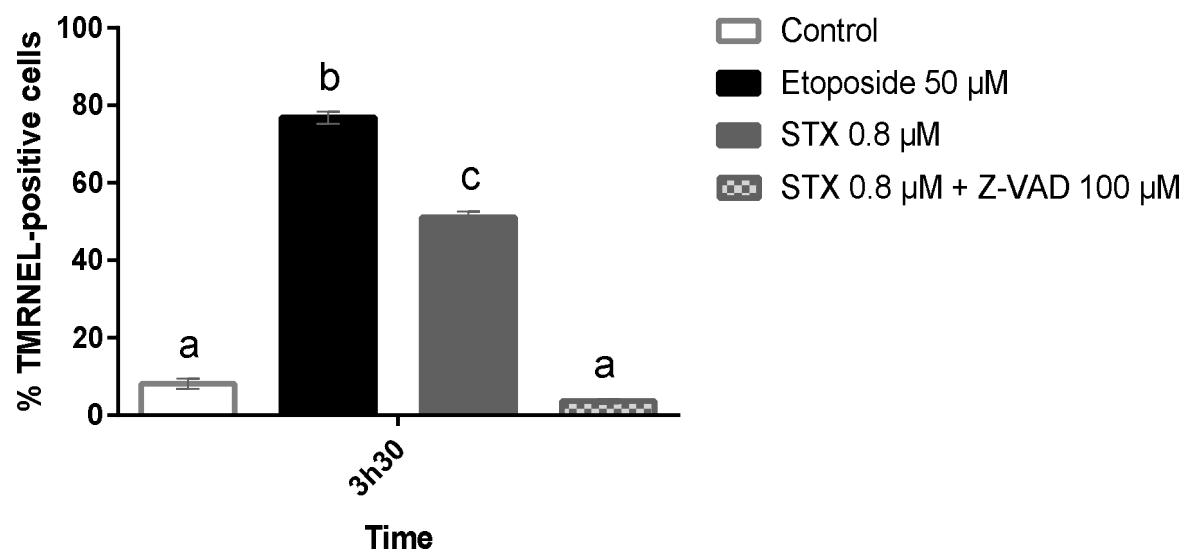


Figure 3. Saxitoxin induces the caspase-dependent cell death of *C. gigas* hemocytes.

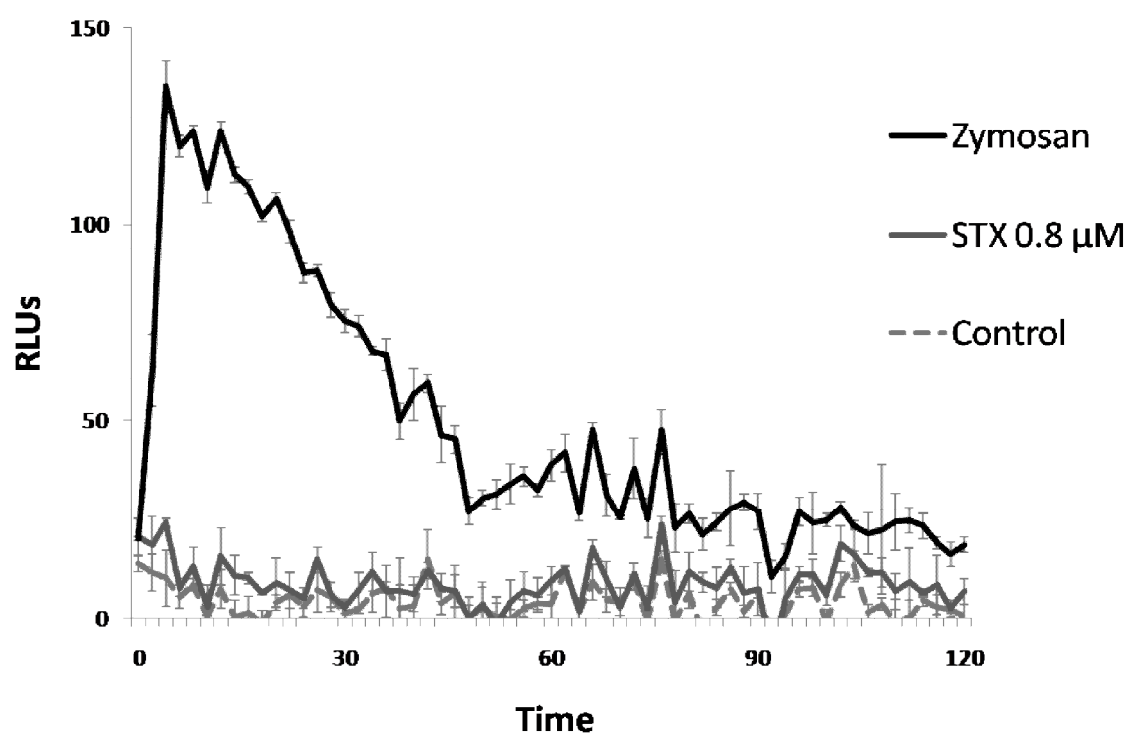


Figure 4. Exposure of *C. gigas* hemocytes to Saxitoxin doesn't induce ROS production.

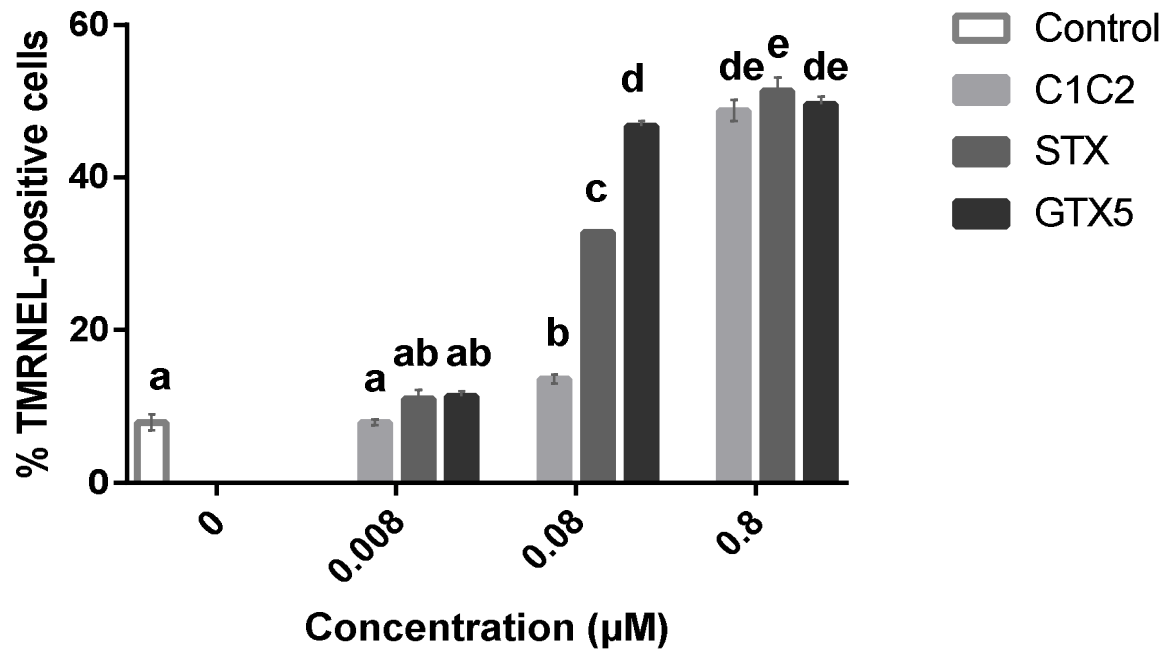


Figure 5. GTX5 is more toxic than STX and C1C2 to oyster hemocytes.

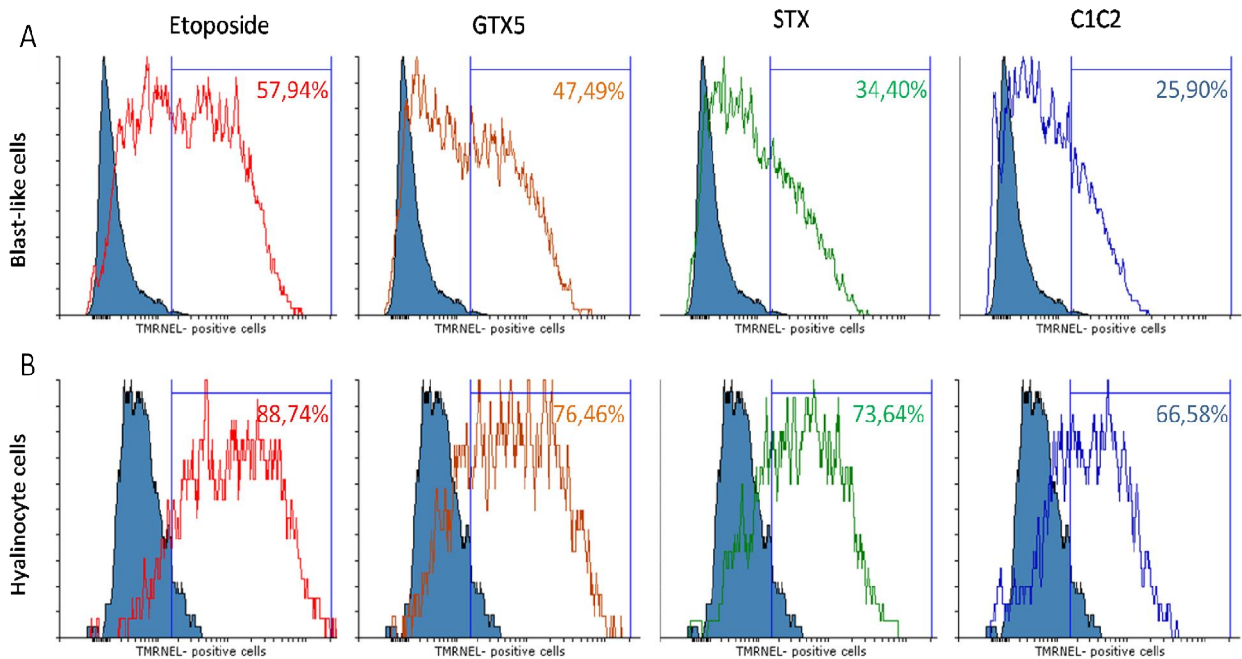


Figure 6. Hyalinocytes are more susceptible to PSTs than blast-like cells.

Supplementary figures

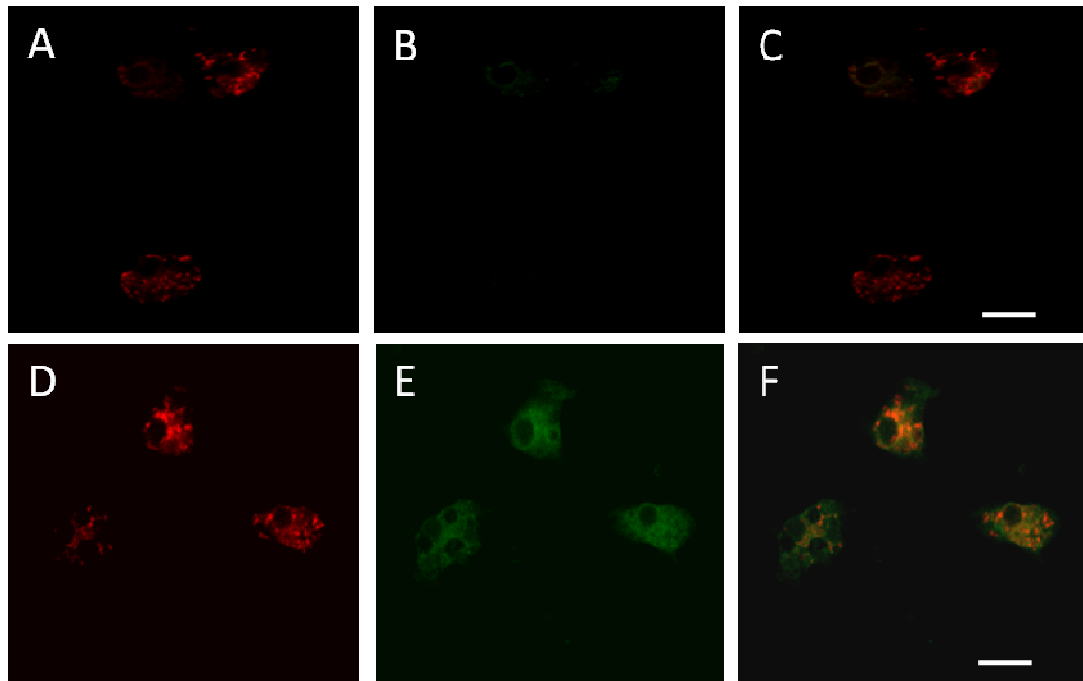


Figure S1. Coumarin does not bind to *C. gigas* hemocytes.

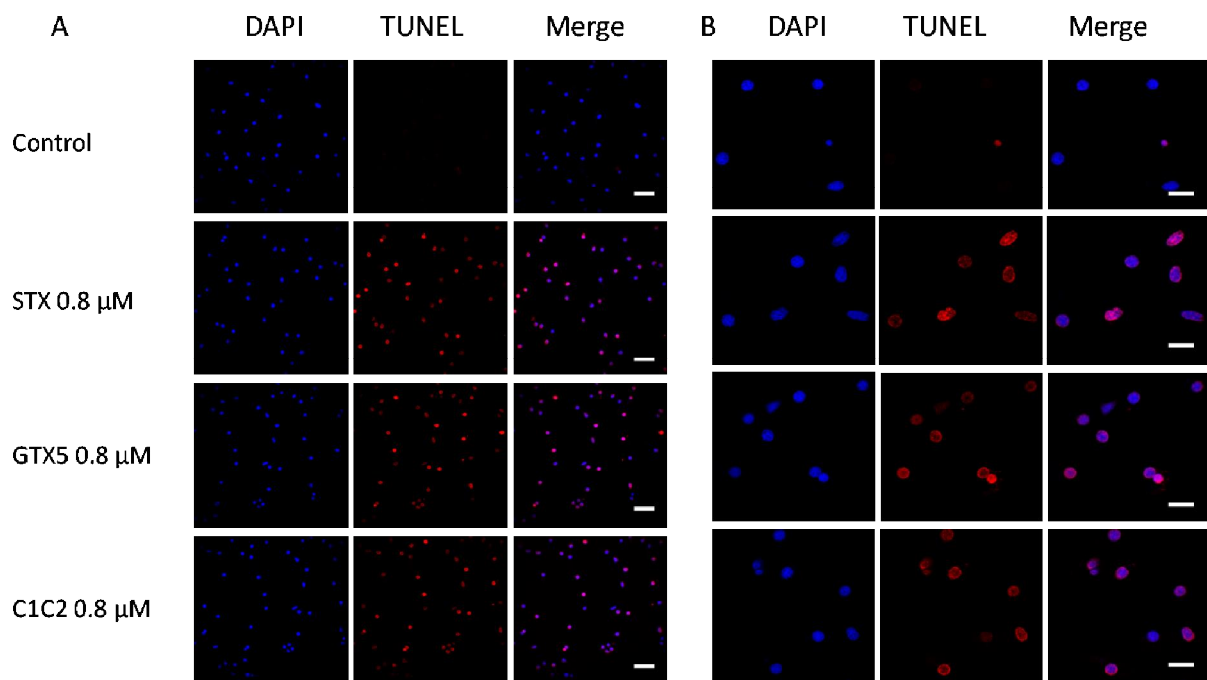


Figure S2. Representative images of hemocytes exposed *in vitro* for 3h30 to different PSTs.

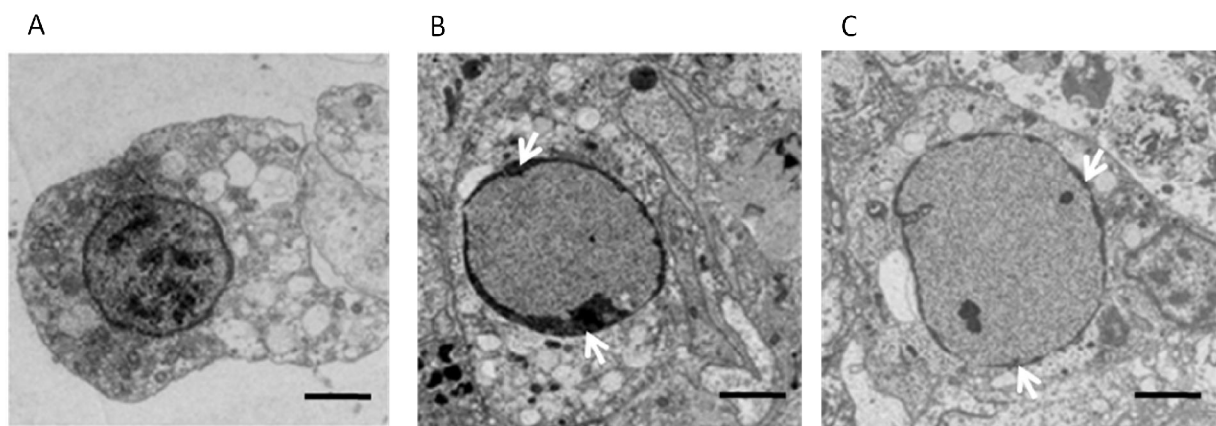


Figure S3. Representative images of transmission electron microscopy of STX-induced cell damages.

CHAPITRE III :
DISCUSSION GENERALE ET
PERSPECTIVES

CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans cette thèse, nous nous sommes attachés à (1) étudier le rôle possible du dinoflagellé *Alexandrium catenella*, producteur de toxines paralysantes (PSTs), dans les phénomènes massifs et récurrents de mortalités de l'huître creuse *Crassostrea gigas* observés le long des côtes françaises, et (2) à caractériser plus particulièrement l'effet de ces toxines sur les cellules immunitaires de l'huître. Cette discussion met nos résultats en perspective de ceux trouvés dans la littérature pour d'autres modèles d'invertébrés marins.

(1) Implication possible d'*Alexandrium catenella* dans les phénomènes de mortalités d'huîtres

Cette thèse a permis d'établir pour la première fois un lien direct entre une pré-exposition d'un invertébré marin à un producteur de toxines paralysantes (PSTs) et une sensibilité aux mortalités induites par un microorganisme pathogène de l'huître. En effet, nous avons montré que le dinoflagellé toxique *A. catenella* augmentait la sensibilité de l'huître *Crassostrea gigas* au pathogène *Vibrio tasmaniensis* LGP32. La présence de toxines PSTs dans les huîtres lors des mortalités *in situ* (lagune de Thau, 2014) a également été mise évidence. Ces résultats suggèrent que le développement d'*A. catenella* dans la lagune de Thau pourrait être un facteur aggravant lors des mortalités d'huîtres juvéniles.

***A. catenella* est présente dans la lagune de Thau et ses PSTs s'accumulent dans les tissus de l'huître pendant les périodes de mortalités.**

In situ, nous avons mis en évidence que la mortalité des huîtres juvéniles de *C. gigas* observée en 2014 dans la lagune de Thau est survenue alors que l'algue toxique *A. catenella* était présente dans la colonne d'eau et que la chair des huîtres était contaminée par les PSTs. Une telle contamination des huîtres par les PSTs dans la lagune de Thau au moment des mortalités a été déjà observée en 2011 et publiée pour la première fois en 2014 par Rolland et ses collaborateurs

(annexe). Les PSTs étaient présents à des concentrations avoisinant les 920 pg.kg^{-1} de poids de glande digestive d'huître en mai 2011 lorsque la mortalité des huîtres a eu lieu (annexe). De manière remarquable, dans la présente étude, les toxines ont été détectées dans les tissus d'huîtres depuis janvier 2014 à des concentrations avoisinant les $350 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids de tissus d'huître, tandis que les mortalités se sont produites seulement en Avril et mai 2014. Ces résultats indiquent bien que la contamination de l'huître par les PSTs n'est pas suffisante pour induire des mortalités, mais pourrait contribuer à aggraver la mortalité des huîtres de manière multifactorielle impliquant les vibrios et/ou autres agents pathogènes (Lemire et al., 2015, Petton et al., 2015).

La présence d'*A. catenella* dans la colonne d'eau augmente la susceptibilité des huîtres à *V. tasmaniensis* LGP32, pathogène de l'huître.

En conditions expérimentales contrôlées, nous avons démontré que l'exposition à *A. catenella* augmentait la sensibilité des huîtres juvéniles de *C. gigas* à un de leurs pathogènes, la souche *V. tasmaniensis* LGP32. En effet une augmentation significative de la mortalité des huîtres induite par cette souche de *Vibrio* a été observée après exposition à la microlague toxique *A. catenella*, alors que des algues non toxiques n'ont pas eu cet effet délétère. Notre équipe avait précédemment montré que l'exposition à ce dinoflagellé toxique à des concentrations algales dans l'eau similaires à celles observées *in situ* lors d'une efflorescence d'algues toxiques, était capable d'induire *in vivo* l'apoptose des hémocytes de *C. gigas* (Medhioub et al., 2013). L'apoptose a été observée 24h après l'exposition à *A. catenella*, ce qui correspond au temps que nous avons utilisé pour l'infection des huîtres dans notre expérience. Une telle destruction des hémocytes, qui jouent un rôle clé dans le mécanisme de défense des invertébrés (Bachere et al., 2015), pourrait fortement affecter les capacités de résistance des huîtres face à une infection bactérienne et être responsable de la sensibilité accrue de *C. gigas* observée ici (Abi-Khalil et al., 2016).

De manière intéressante, Lassudrie et ses collaborateurs ont montré à l'inverse que l'exposition des huîtres à cette même algue, *A. catenella*, réduisait l'infection des huîtres par l'herpèsvirus OsHV-1 (Lassudrie et al., 2015), qui est un pathogène viral systématiquement associé aux surmortalités d'huîtres juvéniles. La sensibilité des huîtres à ces différents agents

pathogènes est déterminée par différentes réactions immunitaires nécessaires impliquées dans la réponse antivirale ou antibactérienne et récemment étudiées par (Zhang et al., 2015). Le rapprochement des résultats de notre équipe (Abi-Khalil et al., 2016) et ceux de Lassudrie et al. suggèrent que les PSTs pourraient polariser la réponse immunitaire de l'huître en déclenchant des mécanismes immunitaires qui prédisposent aux infections bactériennes, mais protègent contre les infections virales. On peut également envisager que ceci résulte d'une activité lytique/toxique de la souche d'*A. catenella* utilisée (ACT03) envers des populations d'hémocytes impliquées dans la réponse antibactérienne, en raison de composés allélochimiques, soit un facteur supplémentaire augmentant la sensibilité des huîtres aux vibrios (Fistarol et al., 2004b).

Pour valider ou infirmer ces hypothèses, il serait maintenant nécessaire (i) d'identifier/caractériser les modifications des populations hémocytaires, et (ii) de caractériser par RNAseq la réponse transcriptionnelle des hémocytes chez des huîtres juvéniles exposées soit à *A. catenella* productrice de toxines PSTs, soit à des souches phylogénétiquement proches non productrices de PSTs, comme *A. tamarensis*.

L'accumulation et la biotransformation des PSTs dans les tissus d'huîtres exposées à *A. catenella*.

L'accumulation des PSTs dans les tissus d'huîtres exposées à *A. catenella* présentant des taux de mortalité plus élevés que ceux des huîtres exposées aux microalgues non toxiques, suggère un effet négatif des algues toxiques sur l'immunité des huîtres. De plus, le profil toxinique des cellules d'*A. catenella* avant ingestion par les huîtres est très différent de celui retrouvé dans les huîtres nourries avec cette même algue. En effet, le dérivé toxinique GTX2, qui était sous forme de traces dans les cellules d'*A. catenella*, est détecté d'une manière significative dans les huîtres mortes trois jours après l'infection, et sa concentration a augmenté de façon continue jusqu'au dernier jour de l'exposition expérimentale. Il est très probable que les toxines accumulées dans les huîtres subissent une bioconversion ou interconversion métabolique conduisant à la disparition de certaines toxines (GTX5, C2 et autres) et à l'apparition de nouveaux dérivés (GTX2). Une telle interconversion métabolique et une élimination des toxines a déjà été discutée dans la littérature (Cembella et al., 1994, Oshima, 1995, Suzuki et al., 2003, Bougrier et al., 2003, Rolland et al., 2012). De plus, comme les PSTs sont des dérivés d'un même squelette

moléculaire (voir rappels bibliographiques), ces observations suggèrent qu'un processus de biotransformation important a eu lieu dans les tissus de *C. gigas*, sans doute due à l'action des enzymes de l'huître. Toutefois, on ne peut pas éliminer l'hypothèse que ce changement de profil toxinique au sein des tissus de l'huître soit dû à une adsorption sélective des toxines dans les tissus d'huîtres, les divers dérivés toxiques pouvant avoir des propriétés d'hydrophobie et de charge qui modifient leur capacité d'adsorption tissulaire ou de liaison à d'éventuels récepteurs.

Nous avons observé que les dérivés toxiques C2 et GTX2 se sont également accumulés dans les huîtres survivantes à la fin de l'expérience. GTX2 est aussi retrouvé chez les huîtres survivantes exposées *in situ* aux efflorescences naturelles d'*A. catenella*. D'une façon intéressante, C2 est le dérivé toxinique le moins toxique sur les cellules immunitaires de l'huître *in vitro* (Abi-khalil et al., en préparation). Cela suggère fortement que ces toxines, résultant de la biotransformation (car absentes du profil toxinique des algues avant ingestion), ont une faible toxicité et n'affectent pas ou très peu la capacité des huîtres à résister contre l'infection par *Vibrio*. Dans ce cas, la bioconversion observée serait le résultat d'une détoxification active. Le niveau de toxicité de GTX2 sur les cellules immunitaires de l'huître reste à tester dans de futurs travaux.

L'élimination des toxines ou la détoxification est classiquement décrite comme une suite de deux cinétiques : une première rapide qui correspond à l'élimination des toxines libres dans le tractus digestif, suivie d'une seconde beaucoup plus lente qui résulte de l'élimination des toxines des différents tissus (Silvert and Cembella, 1995). De plus, même si l'état physiologique des mollusques bivalves ainsi que leur métabolisme semblent influencer de façon importante la détoxification, l'huître *C. gigas* est considérée comme une espèce à détoxification rapide (quelques jours à quelques semaines) (Lassus et al., 2005, Gueguen et al., 2008a). Quant aux biotransformations dans les mollusques, celles-ci sont liées aux conditions physicochimiques, aux enzymes digestives ainsi qu'aux bactéries naturellement présentes dans le mollusque (Sato et al., 2000, Smith et al., 2001) et ont comme siège privilégié l'estomac et la glande digestive. Cependant, il existe de grandes différences dans les capacités de biotransformation entre les mollusques (Lin et al., 2004). En effet, alors que les ormeaux *Haliotis midae* ont un fort pouvoir de biotransformation (Pitcher et al., 2001), les moules *Mytilus edulis* et les huîtres *Crassostrea*

gigas sont décrites à présent comme des espèces ayant peu de capacités de biotransformation (Jaime et al., 2007). Ceci semble assez contredit par nos observations chez l'huître (Abi-Khalil et al., 2016). En effet, dans notre étude, la biotransformation des PSTs dans les tissus de *C. gigas* infectées par *Vibrio* était importante. Ceci peut être dû aux conditions physicochimiques utilisées (huîtres baignées dans de l'eau de mer à 20°C) qui ont pu optimiser l'activité des enzymes digestives dans le mollusque, et/ou à l'activité enzymatique de certaines bactéries dans l'huître, en particulier les vibrios.

L'ingestion des algues productrices de PSTs pourrait aggraver les épisodes de mortalités des huîtres juvéniles.

En conclusion, nous avons montré que l'accumulation accrue des PSTs dans les huîtres, telle qu'observée dans nos travaux, les rend plus susceptibles à l'un des vibrios pathogènes associés aux mortalités d'huîtres juvéniles. Cette accumulation pourrait donc fortement fragiliser les huîtres et les rendre davantage susceptibles aux infections opportunistes, aggravant ainsi les épisodes de mortalités observés. L'augmentation de la susceptibilité des huîtres aux pathogènes induite par les algues toxiques est un mécanisme qui pourrait donc s'ajouter aujourd'hui aux facteurs biotiques et abiotiques contribuant aux épisodes de mortalités massives des huîtres juvéniles.

La mise en évidence d'une part de l'action délétère des microalgues toxiques sur la susceptibilité des huîtres aux vibrios pathogènes, et d'autre part de la présence des toxines algales dans les huîtres au cours de deux événements de mortalité successifs, nous amènent à reconsidérer le rôle des microalgues toxiques dans la santé des élevages ostréicoles. En effet, jusqu'ici, l'absence de corrélation temporelle entre les blooms d'algues toxiques et les mortalités d'huîtres n'a pas amené la communauté à les considérer comme un facteur pouvant contribuer à des événements de mortalités. Nos travaux ont montré qu'une lente accumulation des toxines s'opère dans les tissus de l'huître au cours de l'année et que celle-ci s'approche parfois très près des seuils sanitaires alors que les blooms d'algues toxiques ne sont pas détectés dans la lagune de Thau. Ceci nous amène aujourd'hui à proposer de suivre la dynamique annuelle des toxines algales dans la chair des huîtres et à considérer cette contamination comme un paramètre à

prendre en compte pour caractériser l'intensité des pertes associées aux mortalités multifactorielles des huîtres dont l'origine infectieuse est aujourd'hui bien démontrée.

Par ailleurs, au-delà des effets délétères d'*A. catenella* sur les cellules immunitaires de l'huître, d'autres recherches se concentrant sur les interactions directes entre les toxines et les bactéries seront également à développer : elles pourraient elles aussi être impliquées dans l'aggravation de la susceptibilité des huîtres aux vibrioses. Divers projets de recherche portés par notre équipe de recherche ont commencé à explorer ces hypothèses. Dans le cadre du projet Ec2Co InterVibrio, la question est posée de savoir si *A. catenella* facilite la transmission de la souche *V. tasmaniensis* LGP32 aux huîtres. En parallèle, dans le cadre du projet AlgoVir (CS Ifremer), la question est de savoir si l'interaction de la souche LGP32 avec cette même microalgue toxique induit une surexpression de facteurs toxiques ou d'adhésines pouvant conférer une virulence accrue à ce pathogène.

Au-delà de ces hypothèses, les interactions *Vibrio*/algues toxiques sont également explorées dans l'équipe à l'échelle de l'écosystème (projet Roseobacter). Il est en effet vraisemblable que des interactions étroites existent *in situ* entre ces deux partenaires et qu'elles contribuent à la dynamique des blooms d'algues toxiques ainsi qu'à la persistance du pathogène dans le milieu. En effet, au cours de ma thèse, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont montré que (i) la culture du pathogène de l'huître *V. tasmaniensis* LGP32 en présence d'*A. catenella* dans de l'eau de mer induisait une lyse de cette algue suivie d'une stimulation de la croissance du pathogène (Stage de Tristan Milhau, IUT, 2013). Ensuite, (ii) nous avons mis en évidence que les extraits cellulaires de cette même algue stimulaient la croissance de *V. tasmaniensis* LGP32 en eau de mer (Stage d'Amaury Payelleville, Master1, UM, 2014), et (iii) augmentaient sa virulence suite à une infection des huîtres juvéniles (Stage de Leny Calvez, Master2, UM, 2015). Ces résultats suggèrent que dans le milieu naturel, la microalgue toxique *A. catenella* pourrait être une source de nourriture pour les vibrios pathogènes d'huître. Il faudra déterminer si au-delà, ces interactions peuvent stimuler la production de facteurs de virulence. Cette question est actuellement à l'étude dans le projet AlgoVir.

(2) Effets des toxines paralysantes produites par *Alexandrium catenella* sur les cellules immunitaires de l'huître *Crassostrea gigas*

L'étude des mécanismes d'interaction des PSTs avec le système immunitaire des huîtres nous est apparue cruciale pour comprendre comment *Alexandrium catenella* (i) affecte les capacités de résistance des huîtres face à une infection bactérienne, (ii) et est responsable de la sensibilité accrue de *Crassostrea gigas* observée dans cette étude. Cette question a été abordée dans la seconde partie de ma thèse.

Cette thèse a permis de démontrer pour la première fois que les toxines paralysantes (PSTs) produites par *A. catenella*, sont suffisantes pour induire la mort des cellules immunitaires de l'huître *C. gigas*, les hémocytes. En effet, *in vitro*, nous avons montré que la saxitoxine se lie à des structures granulaires présentes dans le cytoplasme des hémocytes de *C. gigas* et induit une mort hémocytaire caspases-dépendante sans stimuler la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Nous avons également démontré (i) que parmi les populations hémocytaires touchées, les hyalinocytes étaient très sensibles à ce stress toxique, et (ii) que le dérivé toxinique GTX5, qui est présent en grandes quantités dans les cellules d'*A. catenella*, était le PST le plus toxique sur les hémocytes de *C. gigas*. Les hémocytes jouent un rôle central dans la défense de l'huître (Bachere et al., 2015). Il est très probable que leur mort cellulaire induite par les PSTs affecte négativement la défense des mollusques bivalves pouvant ainsi expliquer la diminution de la résistance des huîtres à l'infection par *Vibrio* quand elles sont exposées à *A. catenella*.

Les PSTs induisent une mort cellulaire caspases-dépendante des hémocytes de l'huître *C. gigas*.

Des études précédentes, à la fois *in vitro* et *in vivo*, avaient montré que l'exposition aux algues productrices de PSTs augmentait la mortalité des hémocytes de l'huître (Hegaret et al., 2011, Lassudrie et al., 2016). Ainsi notre équipe a récemment montré des effets apoptotiques d'*Alexandrium catenella* sur les hémocytes de *C. gigas* (Medhioub et al., 2013). Estrada et al. ont ensuite observé des effets similaires chez des huîtres exposées à *Gymnodinium catenatum* (Estrada et al., 2014), un dinoflagellé qui produit également GTX5, C1 et C2 comme toxines

majeures. Une question encore non résolue était de savoir si ces dommages étaient induits par les toxines elles-mêmes. Par une approche *in vitro*, associant des PSTs de synthèse et des hémocytes d'huîtres isolés, nous avons montré dans l'article II de cette thèse (Abi-Khalil et al., en préparation) que la saxitoxine (STX) et ses analogues GTX5 et C1C2, produits par le dinoflagellé *A. catenella*, induisaient une mort cellulaire caspases-dépendante des hémocytes de l'huître *C. gigas*. Nous avons observé que cette mort cellulaire était également dose-dépendante. En effet, suite à un marquage TMRNEL, nous avons pu observer une fragmentation massive de l'ADN nucléaire des hémocytes de l'huître induite par les PSTs à des concentrations aussi faibles que $0,08 \mu\text{M}$. L'utilisation du bloqueur des caspases, le Z-VAD-FMK, a ensuite permis de montrer que cette mort était caspases-dépendante. Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois que des PSTs isolées sont suffisantes à elles seules à induire la mort cellulaire hémocytaire (Abi-Khalil et al., en préparation). Ces toxines sont donc probablement responsables de l'induction de l'apoptose hémocytaire précédemment observée chez les huîtres exposées aux algues productrices de PSTs.

Divers facteurs de stress, physiques ou chimiques, peuvent induire la mort cellulaire chez les hémocytes des mollusques. C'est le cas du cadmium qui induit l'apoptose *in vitro* des hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea virginica* à travers une voie de mitochondries/caspases-indépendante (Sokolova et al., 2004). Chez l'huître plate *Ostrea edulis*, les effets apoptotiques des UVs sur les hémocytes d'huîtres ont également été observés (Gervais et al., 2015). Notre étude montre que les PSTs ont également cette propriété.

La mort hémocytaire induite par les PSTs rappelle surtout l'apoptose. Néanmoins, pour distinguer clairement l'apoptose de la pyroptose (également dépendante des caspases), et de la nécrose, nous avons utilisé une série de caractérisations moléculaires et cellulaires. Tout d'abord, nous avons montré qu'il s'agissait d'un phénomène de cassure de l'ADN dépendant des caspases, ce qui élimine l'hypothèse de la nécrose. Ensuite, l'observation morphologique des caractéristiques ultrastructurales des hémocytes exposés à la STX par microscopie électronique à transmission (MET) a montré de nombreux événements de condensation chromatinienne similaires à ceux observés avec l'étoposide, un inducteur bien connu de l'apoptose. Cependant, toutes les caractéristiques typiques des cellules apoptotiques n'ont pas été observées. En

particulier, nous n'avons observé aucun signe de la perturbation de la paroi cellulaire ou de condensation nucléaire. Il est important de relever que ces phénomènes n'ont pas non plus été observés sur des hémocytes exposés à l'œtoposide. Une explication possible de l'absence des caractéristiques typiques de l'apoptose serait la phagocytose des corps apoptotiques par les hémocytes au temps de notre observation (3h30 après exposition aux toxines). En effet, des corps phagocytés sont observés, et à ce temps d'observation, il est très probable que la condensation nucléaire a déjà eu lieu. L'observation de temps plus courts en microscopie électronique pourrait nous permettre de répondre à cette hypothèse. En effet, la cinétique de l'apoptose chez les mollusques bivalves ainsi que ses caractéristiques ultrastructurales ne sont pas bien décrites à ce jour. Il serait intéressant d'explorer les différents changements morphologiques au cours de l'induction du phénomène apoptotique chez les huîtres afin d'établir les traits ultrastructuraux clés l'accompagnant ainsi que sa cinétique, en utilisant comme contrôle un inducteur connu de l'apoptose (l'œtoposide).

Nous formulons l'hypothèse que la mort cellulaire caspases-dépendante induite par les PSTs est probablement liée à l'apoptose. La pyroptose (dépendante de la caspase-1) paraît peu probable. En effet, suite à une étude *in vivo* d'exposition des huîtres *C. gigas* à *A. catenella*, notre équipe a montré que les caspases effectrices -3 et -7 impliquées dans l'apoptose ont été surexprimées lorsque l'apoptose des hémocytes a eu lieu (Medhioub et al., 2013). Au contraire, la caspase-1, n'a pas été induite (Medhioub et al., 2013). Cela suggère fortement que la STX induit une apoptose dans les hémocytes de *C. gigas* par une voie caspases-dépendante et que les effets apoptotiques d'*A. catenella* productrice de PSTs, sont déclenchés par les toxines elles-mêmes. Les mêmes analyses transcriptomiques pourraient être effectuées sur des hémocytes exposés aux PSTs dans les conditions *in vitro* de notre article pour démontrer cela directement. Un marquage des hémocytes exposés aux PSTs à l'annexine V serait aussi indispensable pour mettre en évidence l'exposition des phosphatidyl sérines sur la face externe de la membrane plasmique, une caractéristique essentielle de l'apoptose.

La mort cellulaire des hémocytes induite par STX est indépendante de la production de ROS chez *C. gigas*.

Nous avons montré dans cette thèse que le déclenchement de la mort cellulaire des hémocytes de l'huître était indépendant de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). En effet, il est connu que les ROS peuvent faciliter la perturbation de la membrane mitochondriale et favoriser ainsi l'ouverture des canaux (Kim et al., 2006). Les constituants cellulaires sont altérés via la génération de produits de stress oxydatif toxiques tels que le radical superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$). Néanmoins, dans cette étude et dans des conditions inductrices de ~ 55% de mort cellulaire, les hémocytes exposés à la STX ne présentaient aucune augmentation de la production de ROS. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures montrant que l'exposition au dinoflagellé producteur de PSTs, *Alexandrium minutum*, et sa STX purifiée induit une diminution de la production de ROS dans les hémocytes de *C. gigas* (Hegaret et al., 2011, Mello et al., 2013). Le burst oxydatif a été très largement décrit pour son rôle majeur dans la phagocytose chez l'huître (Bachère et al., 1991, Bachère et al., 2004, Poirier et al., 2014). Cependant, il ne semble pas impliqué dans les phénomènes de mort cellulaires induits par les phycotoxines. On peut plutôt imaginer que le phénomène est induit par une interaction cellulaire directe, comme mise en évidence dans l'article II (Abi-Khalil et al., en préparation).

La saxitoxine cible des structures cytoplasmiques des hémocytes de l'huître *C. gigas*.

In vitro, cette thèse a également précisé les cibles cellulaires de la saxitoxine (STX) chez l'huître *Crassostrea gigas*. En effet, nous avons montré que la STX, produite par *Alexandrium catenella*, cible les cellules immunitaires de *C. gigas*, les hémocytes, en se fixant à des organites cytoplasmiques autres que les mitochondries. Ces structures restent non caractérisées dans le cadre de mes travaux. Parmi les cibles moléculaires de la STX déjà décrites chez les vertébrés, on peut citer les canaux sodiques situés à la membrane des cellules nerveuses et musculaires (Kao, 1972, Narahashi, 1972), mais aussi des transporteurs de cuivre (Cusick et al., 2012). Le marquage intracytosolique que nous avons observé rappelle les observations de Ritchie et al. qui ont montré que la STX se liait aux canaux sodiques situés dans des organites cytoplasmiques des

cellules de Schwann des vertébrés (Ritchie et al., 1990). Mais on peut également suspecter une liaison à Ctr1, le transporteur du cuivre décrit pour lier la saxitoxine (Cusick et al., 2012) et dont le gène est présent chez l'huître. Cette dernière hypothèse est particulièrement séduisante à tester. En effet, les travaux récents de l'équipe ont montré que le pathogène *V. tasmaniensis* LGP32 utilisait l'efflux de cuivre pour résister à la dégradation par les hémocytes (Vanhove et al., 2016). Or nous avons montré dans l'article I de cette thèse, que l'exposition aux PSTs rendait les huîtres significativement plus sensibles à cette souche. Si les PSTs sont effectivement capables de se lier à Ctr1, il est vraisemblable qu'elles bloquent l'import du cuivre dans les phagosomes hémocytaires, ce qui expliquerait la virulence accrue de la souche LGP32. Un moyen de tester cette hypothèse serait de restaurer la virulence et la survie intracellulaire des mutants de LGP32 déficients pour l'export de cuivre (Vanhove et al., 2016) sur des hémocytes exposés aux PSTs. Ces mutants sont disponibles au laboratoire.

Il faut néanmoins relever que le marquage cytoplasmique observé sur les hémocytes exposés à la STX-Cou pourrait également correspondre à des endosomes chargés en STX. Il est en effet possible que l'internalisation de la STX ne fasse pas appel à des récepteurs particuliers mais passe par un mécanisme d'endocytose et de recyclage de la membrane plasmique. Toutefois, nous ne favorisons pas l'hypothèse d'une endocytose sans récepteur puisque le contrôle Coumarine seule (Cou-Gua) ne présente pas ce profil de localisation cellulaire (aucun marquage n'est observé). Un moyen d'éliminer cette hypothèse serait de bloquer l'internalisation de la STX-Cou par une drogue comme le dynasore.

Si nos travaux ne permettent pas d'identifier à ce stade une cible moléculaire de la STX chez l'huître, il n'en reste pas moins les premiers à avoir mis en évidence des cibles cellulaires. En effet, chez les mollusques bivalves, seule la répartition des PSTs dans les différents tissus avait été étudiée. Ces études ont montré que la grande majorité des PSTs est située dans les tissus viscéraux des bivalves (Bricelj and Shumway, 1998a), comme chez la moule *Mytilus edulis* (Silvert and Cembella, 1995), les palourdes *Hiatala rostrata* et *Callista chione* (Chen and Chou, 2002, Sagou et al., 2005) et l'huître *C. gigas* (Gueguen et al., 2008a). En effet, Gueguen et al. ont montré que les PSTs se répartissent dans les différents tissus de *C. gigas* dès le premier jour de contamination avec une accumulation majoritaire ($64,10 \pm 9,87$ %) dans la glande digestive

(Gueguen et al., 2008a). Cependant, la contribution des hémocytes à cette accumulation n'a pas été évaluée, les données étant obtenues à partir d'extraits totaux de tissus contenant les hémocytes. De même, aucune donnée sur les voies d'entrée des PSTs dans les tissus des huîtres n'existe pour le moment. Si nos résultats montrent que les hémocytes de l'huître sont une cible de la STX, il n'est pas étudié à ce jour si les PSTs ciblent d'autres tissus de *C. gigas*. Leur tropisme tissulaire pourrait ainsi être étudié en utilisant des techniques d'imagerie du vivant après injection de la toxine dans les animaux.

Parmi les populations hémocytaires de *C. gigas*, les hyalinocytes sont plus sensibles à la mort cellulaire caspases-dépendante que les cellules blast-like.

Au cours de cette thèse, nous avons pu séparer les 2 sous-populations hémocytaires non granulaires de l'huître *Crassostrea gigas*, les hyalinocytes et les blast-like, en utilisant la cytométrie en flux. Cette technique nous a permis de mettre en corrélation, sur des cellules isolées, des caractéristiques multiples telles que la fluorescence, la taille et la granulosité. Cependant, comme les conditions de culture reposent sur une étape d'adhésion hémocytaire, nous n'avons pas pu étudier les effets potentiels des PSTs testées sur les granulocytes non adhérents. Cette méthode qualitative et quantitative a montré que les hyalinocytes étaient plus sensibles à la mort cellulaire induite par les PSTs que les cellules blast-like, indépendamment du PST utilisé. En effet, lorsque les hémocytes de l'huître ont été exposés à $0,08 \mu\text{M}$ de PSTs, le pourcentage d'hyalinocytes montrant une fragmentation nucléaire était entre 66,6 à 76,5% en fonction du PSTs utilisé contre 25,9 à 47,5% pour les blast-like. Le même effet majeur sur les hyalinocytes a été observé avec l'inducteur de l'apoptose, l'ectoposide, qui a affecté 88,7% de cette population. Ainsi, les hyalinocytes d'huîtres semblent être très sensibles aux programmes de mort cellulaire caspases-dépendant indépendamment de l'inducteur utilisé.

Les hyalinocytes abritent une activité de phagocytose puissante et sont des effecteurs cellulaires clés de la phagocytose intégrine-dépendante chez *C. gigas* (Terahara et al., 2006). Bachère et al. ont émis l'hypothèse que ces cellules non granulaires correspondent à la même lignée cellulaire observée à différents stades de maturation et d'activité et dans laquelle les cellules blast-like étaient les plus petits et les plus jeunes (Bachère et al., 2004). On pourrait ainsi

émettre l'hypothèse que la plus faible sensibilité des blast-like à la mort cellulaire induite par les PSTs pourrait être due à la plus faible expression de ligands PSTs dans les jeunes cellules blast-like que dans les hyalinocytes matures.

Le GTX5 est le dérivé toxinique le plus toxique sur les hémocytes de l'huître *C. gigas*.

Dans cette thèse, nous avons également montré que parmi les principaux PSTs produits par *Alexandrium catenella*, GTX5 induisait l'effet toxique le plus fort sur les hémocytes de l'huître. Ce résultat diffère de la toxicité connue des PSTs sur les cellules humaines où la STX est décrite comme le composé le plus toxique (Cembella, 1998). En effet, l'analyse en cytométrie de flux a montré que la plus grande toxicité de GTX5 par rapport à celle de STX et C1C2 respectivement, est en grande partie liée à sa toxicité plus élevée sur les cellules blast-like. En effet, GTX5 induit des dommages mortels importants dans au moins deux populations d'hémocytes avec 47,5% et 76,5% de mort cellulaire chez les blast-like et les hyalinocytes respectivement. Le dérivé C1C2 était beaucoup moins actif contre les cellules blast-like (25,9% de mort cellulaire). Il est intéressant de constater que GTX5, qui est la toxine dominante dans *A. catenella*, était presque absente chez les huîtres nourries de cette algue et infectées par *Vibrio* lors de nos expérimentations au laboratoire. Ces huîtres présentaient en effet un profil toxinique riche en GTX2 et C2 (Abi-Khalil et al., 2016). Cela suggère fortement que la bioconversion de GTX5 qui se produit dans les tissus de l'huître *C. gigas*, s'intègre dans un processus de détoxification contribuant ainsi à la protection de l'huître contre une mort hémocytaire PSTs-induite et par suite contre la suppression immunitaire qui en découle.

Rôle possible des hémocytes dans la détoxification.

Les hémocytes peuvent jouer un rôle dans l'excrétion, comme l'élimination des métaux qui est le résultat d'une endocytose par les hémocytes des mollusques suivie d'une élimination sous-jacente de ces cellules (Orton, 1923). Une migration des hémocytes dans l'intestin des moules et des huîtres a également été mise en évidence lors d'une consommation d'*Alexandrium* spp. (Galimany et al., 2008). Dans notre étude, la STX s'est accumulée dans les hémocytes de

Crassostrea gigas, *in vitro* (Abi-khalil et al., en préparation). Ces observations laissent supposer que les hémocytes pourraient avoir un rôle dans l'élimination de cette toxine.

Des recherches complémentaires sur le rôle des hémocytes pendant la contamination et la détoxification des mollusques bivalves restent nécessaires. Un dosage des toxines dans les hémocytes et dans les tissus de l'huître après une exposition aux algues productrices de PSTs, ou suite à une injection des toxines pourrait ainsi être envisagé.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Cette thèse a porté (i) sur les interactions entre *Alexandrium catenella*, algue productrice de toxines paralysantes (PSTs), et l'huître *Crassostea gigas*, et (ii) sur leurs conséquences en terme de sensibilité aux vibrios pathogènes d'huîtres.

Nous avons montré qu'*A. catenella* augmentait la sensibilité de l'huître *C. gigas* au pathogène *Vibrio tasmaniensis* LGP32 dans des conditions contrôlées au laboratoire. *In situ*, nous avons également constaté la coïncidence entre la mortalité des huîtres en 2014 et la présence des PSTs dans leurs tissus. L'observation terrain suggère ainsi que le développement d'*A. catenella* dans la lagune de Thau pourrait déclencher la mortalité de *C. gigas* (article I).

In vitro, nous avons montré que les PSTs produites par *A. catenella*, sont suffisantes pour induire la mort des hémocytes de *C. gigas*. En effet, nous avons montré que la saxitoxine est associée à des structures granulaires présentes dans le cytoplasme des hémocytes de *C. gigas* et induit une mort hémocytaire caspases-dépendante. Cette mort était indépendante de la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Nous avons également démontré (i) que parmi les PSTs induisant une mort hémocytaire, la gonyautoxine 5 était le dérivé le plus toxique sur les hémocytes de l'huître et (ii) que les hyalinocytes étaient très sensibles à ce stress toxique (article II). Les hémocytes jouent un rôle clé dans la défense immunitaire des huîtres. Ainsi, leur mort cellulaire accrue, induite par les PSTs, a le potentiel de générer un organisme immunodéprimé ayant une capacité réduite pour résister à des affections pathologiques et des infections opportunistes. Nous pouvons ainsi supposer qu'une réduction de la capacité des huîtres exposées à *A. catenella* à résister à l'infection par *Vibrio* (article I), pourrait résulter de la mort hémocytaire induite par les PSTs.

Des voies de recherche restent à explorer pour pouvoir conclure sur l'implication des algues productrices de PSTs dans les phénomènes de mortalités des huîtres juvéniles. Des recherches visant à établir des corrélations entre les mortalités de bivalves et la contamination par les producteurs de PSTs semblent ainsi nécessaires. Une étude plus globale des mécanismes

moléculaires sous-jacents à l'interaction entre *A. catenella* et *C. gigas* pourrait aussi permettre de mieux comprendre comment cette algue augmente la susceptibilité des huîtres aux pathogènes. Cela pourrait avoir des implications importantes en écotoxicologie notamment dans l'évaluation de l'état de santé des bivalves marins exploités et dans la prévention des crises conchyliques en France et dans le monde.

Enfin, une prise en compte globale de l'influence des divers facteurs potentiels impliqués dans les mortalités de *C. gigas* doit être réalisée pour pouvoir mettre en œuvre des stratégies visant à améliorer la résistance des huîtres. Elle nécessite entre autres de caractériser plus en détail les interactions entre les différents facteurs et le poids relatif de chacun d'entre eux dans la mortalité affectant les huîtres.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

-A-

- ABI-KHALIL, C., LOPEZ-JOVEN, C., ABADIE, E., SAVAR, V., AMZIL, Z., LAABIR, M. & ROLLAND, J. L. 2016. Exposure to the Paralytic Shellfish Toxin Producer *Alexandrium catenella* Increases the Susceptibility of the Oyster *Crassostrea gigas* to Pathogenic Vibrios. *Toxins (Basel)*, 8.
- ABOUABDELLAH, R., TALEB, H., BENNOUNA, A., ERLER, K., CHAFIK, A. & MOUKRIM, A. 2008. Paralytic shellfish poisoning toxin profile of mussels *Perna perna* from southern Atlantic coasts of Morocco. *Toxicon*, 51, 780-6.
- ADAMS, J. M. & CORY, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival *Science*, 281, 1322-1326.
- AL-GHELANI, H. M., ALKINDI, A.Y.A, AMER, S., AL-AKHZAMI, Y.K 2005. Harmful Algal Blooms: Physiology, Behavior, Population Dynamics and Global Impacts- A Review. *SQU Journal For Science*, 10 1-30.
- ALADAILEH, S., NAIR, S. V., BIRCH, D. & RAFTOS, D. A. 2007. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. *J Invertebr Pathol*, 96, 48-63.
- AMZIL, Z., FRESNEL, J., LE GAL, D. & BILLARD, C. 2001. Domoic acid accumulation in French shellfish in relation to toxic species of Pseudo-nitzschia multiseriis and *P. pseudodelicatissima*. *Toxicon*, 39, 1245-51.
- ANDERSON, D. M., ALPERMANN, T. J., CEMBELLA, A. D., COLLOS, Y., MASSERET, E. & MONTRESOR, M. 2012. The globally distributed genus *Alexandrium*: multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae*, 14, 10-35.
- ANDERSON, D. M., GLIBERT, P. M. & BURKHOLDER, J. M. 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries*, 25, 704-726.
- ANDERSON, D. M., HOAGLAND, P., KAORU, Y. & WHITE, A. W. 2000. Estimated Annual Economic Impacts of Harmful Algal Blooms (HABs) in the United States.
- ANVEKAR, R. A., ASCIOLLA, J. J., MISSERT, D. J. & CHIPUK, J. E. 2011. Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment. *Front Oncol*, 1.
- ARMSTRONG, P. B. 2006. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology*, 211, 263-81.

- ARTIGAS, M. L., VALE, P. J., GOMES, S. S., BOTELHO, M. J., RODRIGUES, S. M. & AMORIM, A. 2007. Profiles of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Portugal explained by carbamoylase activity. *J Chromatogr A*, 1160, 99-105.
- ARZUL, G., SEGUEL, M., GUZMAN, L. & ERARD-LEDENN, E. 1999. Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 232, p. 285-295.
- ASHKENAZI, A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*, 2, 420-30.
- ASHTON-ALCOX, K. A. & FORD, S. E. 1998. Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue Cell*, 30, 195-204.

-B-

- BACHALI, S., JAGER, M., HASSANIN, A., SCHOENTGEN, F., JOLLES, P., FIALA-MEDIONI, A. & DEUTSCH, J. S. 2002. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *J Mol Evol*, 54, 652-64.
- BACHERE, E., CHAGOT, D. & GRIZEL, H. 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev Comp Immunol*, 12, 549-59.
- BACHERE, E., GUEGUEN, Y., GONZALEZ, M., DE LORGERIL, J., GARNIER, J. & ROMESTAND, B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews*, 198, 149-168.
- BACHÈRE, E., HERVIO, D. & MIALHE, E. 1991. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Org*, 11, 173-180.
- BACHERE, E., ROSA, R. D., SCHMITT, P., POIRIER, A. C., MEROU, N., CHARRIERE, G. M. & DESTOUMIEUX-GARZON, D. 2015. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. *Fish Shellfish Immunol*, 46, 50-64.
- BARDOUIL, M., BOHEC, M., CORMERAIS, M., BOUGRIER, S. & LASSUS, P. 1993. Experimental study of the effects of the toxic micrungal diest on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Shellfish Research* 12, 417-422.
- BARILLÉ, L., HAURE, J., COGNIE, B. & LEROY, A. 2000. Variations in pallial organs and eulatero-frontal cirri in response to high particulate matter concentrations in the oyster *Crassostrea gigas*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57, 837-843.

- BARILLE, L., HERAL, M. & BARILLEBOYER, A. L. 1997. Ecophysiological deterministic model for *Crassostrea gigas* in an estuarine environment. *Aquatic Living Resources*, 10, 31-48.
- BEFORT, K., KARCHEWSKI, L., LANOUE, C. & WOOLF, C. J. 2003. Selective up-regulation of the growth arrest DNA damage-inducible gene Gadd45 alpha in sensory and motor neurons after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci*, 18, 911-22.
- BENINGER, P. G., CANNUEL, R. & JAUNET, S. 2005. Particle processing on the gill plicae of the oyster *Crassostrea gigas*: fine-scale mucocyte distribution and functional correlates. *Marin Ecology-Progress Series*, 295, 191-199.
- BENINGER, P. G., STJEAN, S. D. & POUSSART, Y. 1995. Labial palps of the blue mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mytilidae). *Marine Biology*, 123, 293-303.
- BINESSE, J., DELSERT, C., SAULNIER, D., CHAMPOMIER-VERGES, M. C., ZAGOREC, M., MUNIER-LEHMANN, H., MAZEL, D. & LE ROUX, F. 2008. Metalloprotease vsm is the major determinant of toxicity for extracellular products of *Vibrio splendidus*. *Appl Environ Microbiol*, 74, 7108-17.
- BLANCO, J. Modelling phycotoxins accumulation in bivalves: a review. 5th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, 2004 Galway.
- BLANCO, J., CANO, J., MARINO, M. D. C. & CAMPOS, M. J. 2006. Effect of phytoplankton containing paralytic shellfish and amnesic shellfish toxins on the culture of the king scallop *Pecten maximus* in Malaga (SE Spain). *Aquatic Living Resources* 19:, 267-273.
- BLANCO, J., MORONO, A., FRANCO, J. & REYERO, M. I. 1997. PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One- and two-compartment models and the effect of some environmental variables. *Marine Ecology-Progress Series*, 158, 165-175.
- BOATRIGHT, K. M. & SALVESEN, G. S. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 725-31.
- BOUGRIER, S., LASSUS, P., BARDOUIL, M., MASSELIN, P. & TRUQUET, P. 2003. Paralytic shellfish poison accumulation yields and feeding time activity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and king scallop (*Pecten maximus*). *Aquatic Living Resources* 16, 347-352.
- BRICELJ, V. M. & CEMBELLA, A. D. 1995. Fate of gonyautoxins in surf-clams, *Spisula solidissima*, grazing upon toxigenic *Alexandrium*. In: LASSUS, P., ARZUL, G., ERARD, E., GENTIEN, P. & MARCAILLOU, C. (eds.) *Harmful marine algal blooms*. Paris: Lavoisier, Intercept Ltd.

- BRICELJ, V. M., LEE, J. H. & CEMBELLA, A. D. 1991. Influence of dinoflagellate cell toxicity on uptake and loss of paralytic shellfish toxins in the northern quahog *Mercenaria mercenaria*. *Mar Ecol Prog Ser*, 74, 33-46.
- BRICELJ, V. M. & SHUMWAY, S. E. 1998a. An overview of the occurrence and transfer kinetics of paralytic shellfish toxins in Bivalve molluscs. In: REGUERA B, B. J., FERNANDEZ ML, WYATT T (ed.) *Harmful Algae*.
- BRICELJ, V. M. & SHUMWAY, S. E. 1998b. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics and biotransformation. *Fisheries Science*, 6, 315-383.
- BROGDEN, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3, 238-50.
- BROTZ, H., JOSTEN, M., WIEDEMANN, I., SCHNEIDER, U., GOTZ, F., BIERBAUM, G. & SAHL, H. G. 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol Microbiol*, 30, 317-27.
- BULET, P., STOCKLIN, R. & MENIN, L. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*, 198, 169-84.

-C-

- CEMBELLA, A. D. 1998. Ecophysiology and metabolism of paralytic shellfish Toxins in marine microalgae. In: ANDERSON D.M., C. A. D. H. G. M. (ed.) *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- CEMBELLA, A. D., SHUMWAY, S. E. & LAROCQUE, R. 1994. Sequestering and putative biotransformation of paralytic shellfish toxins by the sea scallop *Placopecten magellanicus*: seasonal and spatial scales in natural populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 180, 1-22.
- CHEN, C. Y. & CHOU, H. N. 2002. Fate of paralytic shellfish poisoning toxins in purple clam *Hiatula rostrata*, in outdoor culture and laboratory culture. *Mar Pollut Bull*, 44, 733-8.
- CHENG, T. C. 1981. Invertebrates blood cells. In: RATCLIFFE, N. A. A. R., A.F (ed.) *Bivalves*. London: Academic Press.
- CHENG, T. C. 1996. Hemocytes: Forms and functions. In: MARYLAND SEA GRANT COLLEGE, U. O. M. S., COLLEGE PARK (ed.) *The eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland.
- CHOI, M. C., YU, P. K., HSIEH, D. P. & LAM, P. K. 2006. Trophic transfer of paralytic shellfish toxins from clams (*Ruditapes philippinarum*) to gastropods (*Nassarius festivus*). *Chemosphere*, 64, 1642-9.

- COLLINS, C., GRAHAM, J., BROWN, L., BRESNAN, E., LACAZE, J. P. & TURRELL, E. A. 2009. Identification and Toxicity of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in Scottish Waters(1). *J Phycol*, 45, 692-703.
- COLLOS, Y., BEC, B., JAUZEIN, C., ABADIE, E., LAUGIER, T., LAUTIER, J., PASTOUREAUD, A., SOUCHU, P. & VAQUER, A. 2009. Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *J. Sea. Res.*, 61 p. 68-75.
- COLLOS, Y., GAGNE, C., LAABIR, M., VAQUER, A., CECCHI, P. & SOUCHU, P. 2004. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau lagoon, southern France. *J. Phycol. Vol*, 40, 96-103.
- COLLOS, Y., VAQUER, A., LAABIR, M., ABADIE, E., LAUGIER, T., PASTOUREAUD, A. & SOUCHU, P. 2007. Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, southern France. *Harmful Algae*, 6, 781-789.
- COMPS, M. & DUTHOIT, J. L. 1979. Infections virales chez les huîtres *Crassostrea angulata* (Lmk) et *C. gigas* (Th.). *Haliotis*, 8, 301-308.
- CONRADT, B. 2009. Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annu Rev Genet*, 43, 493-523.
- CORBEIL, S., FAURY, N., SEGARRA, A. & RENAULT, T. 2015. Development of an in situ hybridization assay for the detection of ostreid herpesvirus type 1 mRNAs in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Virological Methods*, 211, 43-50.
- CORPOREAU, C., GROISILLIER, A., JEUDY, A., BARBEYRON, T., FLEURY, E., FABIoux, C., CZJZEK, M. & HUVET, A. 2011. A functional study of transforming growth factor-beta from the gonad of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol (NY)*, 13, 971-80.
- CORY, A. H., EDWARDS, C. C., HALL, J. G. & CORY, J. G. 2003. Inhibitors of diverse metabolic steps cause increased apoptosis in deoxyadenosine-resistant mouse leukemia L1210 cells that lack p53 expression: convergence at caspase-3 activation. *Adv Enzyme Regul*, 43, 29-45.
- CUSICK, K. D., MINKIN, S. C., DODANI, S. C., CHANG, C. J., WILHELM, S. W. & SAYLER, G. S. 2012. Inhibition of copper uptake in yeast reveals the copper transporter Ctr1p as a potential molecular target of saxitoxin. *Environ Sci Technol*, 46, 2959-66.

-D-

- DE LORGERIL, J., ZENAGUI, R., ROSA, R. D., PIQUEMAL, D. & BACHERE, E. 2011. Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis. *PLoS One*, 6, e23142.
- DEFER, D., BOURGOUGNON, N. & FLEURY, Y. 2009. Detection and partial characterisation of an antimicrobial peptide (littorein) from the marine gastropod *Littorina littorea*. *Int J Antimicrob Agents*, 34, 188-90.
- DESLOUS-PAOLI, J. M., LANNOU, A. M., GEAIRON, P., BOUGRIER, S., RAILLARD, O. & HERAL, M. 1992. Effects of the feeding-behavior of *Crassostrea gigas* (Bivalve mollusks) on biosedimentation of naturel particulate matter. *Hydrobiologia*, 231, 85-91.
- DUPERTHUY, M., BINESSE, J., LE ROUX, F., ROMESTAND, B., CARO, A., GOT, P., GIVAUDAN, A., MAZEL, D., BACHERE, E. & DESTOUMIEUX-GARZON, D. 2010. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ Microbiol*, 12, 951-963.
- DUPERTHUY, M., SCHMITT, P., GARZON, E., CARO, A., ROSA, R. D., LE ROUX, F., LAUTREDOU-AUDOUY, N., GOT, P., ROMESTAND, B., DE LORGERIL, J., KIEFFER-JAQUINOD, S., BACHERE, E. & DESTOUMIEUX-GARZON, D. 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 2993-2998.

-E-

- ECKELMAN, B. P., SALVESEN, G. S. & SCOTT, F. L. 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep*, 7, 988-94.
- ESCOUBAS, J. M., BRIANT, L., MONTAGNANI, C., HEZ, S., DEVAUX, C. & ROCH, P. 1999. Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Lett*, 453, 293-8.
- ESCOUBAS, J. M., GOURBAL, B., DUVAL, D., GREEN, T. J., CHARRIÈRE, G. M., DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. & MONTAGNANI, C. 2016. Immunity in Molluscs. In: RATCLIFFE, M. J. H. (ed.) *Encyclopedia of Immunobiology*. Oxford: Academic Press.
- ESTRADA, N., ASCENCIO, F., SHOSHANI, L. & CONTRERAS, R. G. 2014. Apoptosis of hemocytes from lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* induced with paralyzing shellfish poison from *Gymnodinium catenatum*. *Immunobiology*, 219, 964-74.

-F-

- FABER, S. 2012. Saxitoxin and the induction of paralytic shellfish poisoning. *Journal of Young Investigators*, Vol. 23.
- FENSOME, A., WHATMORE, J., MORGAN, C., JONES, D. & COCKCROFT, S. 1998. ADP-ribosylation factor and Rho proteins mediate fMLP-dependent activation of phospholipase D in human neutrophils. *J Biol Chem*, 273, 13157-64.
- FERNANDEZ, M. L., SHUMWAY, S. E. & BLANCO, J. 2003. Management of shellfish resources. In: HALLEGRAEFF, G. M., A., D. M. & CEMBELLA, A. D. (eds.) *Manual on harmful marine microalgae. IOC Manuals and guides*.
- FESIK, S. W. & SHI, Y. 2001. Structural biology. Controlling the caspases. *Science*, 294, 1477-8.
- FISCHER, U., JANICKE, R. U. & SCHULZE-OSTHOFF, K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 10, 76-100.
- FISTAROL, G. O., LEGRAND, C., RENGEFORS, K. & GRANALI, E. 2004a. Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? *Environ Microbiol*, 6, 791-8.
- FISTAROL, G. O., LEGRAND, C., SELANDER, E., HUMMERT, C., STOLTE, W. & GRANALI, E. 2004b. Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquatic Microbial Ecology*, 35, 45-56.
- FLANNAGAN, R. S., JAUMOUILLE, V. & GRINSTEIN, S. 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol*, 7, 61-98.
- FLEURY, E., FABIoux, C., LELONG, C., FAVREL, P. & HUVET, A. 2008. Characterization of a gonad-specific transforming growth factor-beta superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Gene*, 410, 187-96.
- FLEWELLING, L. J., NAAR, J. P., ABBOTT, J. P., BADEN, D. G., BARROS, N. B., BOSSART, G. D., BOTTEIN, M. Y., HAMMOND, D. G., HAUBOLD, E. M., HEIL, C. A., HENRY, M. S., JACOBS, H. M., LEIGHFIELD, T. A., PIERCE, R. H., PITCHFORD, T. D., ROMMEL, S. A., SCOTT, P. S., STEIDINGER, K. A., TRUBY, E. W., VAN DOLAH, F. M. & LANDSBERG, J. H. 2005. Brevetoxicosis: red tides and marine mammal mortalities. *Nature*, 435, 755-6.
- FLORES-NUNES, F., GOMES, T., COMPANY, R., MORAES, R. R., SASAKI, S. T., TANIGUCHI, S., BICEGO, M. C., MELO, C. M., BAINY, A. C. & BEBIANNO, M. J. 2015. Changes in protein expression of pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed in situ to urban sewage. *Environ Sci Pollut Res Int*, 22, 17267-79.

FRÉMY, J. M. & LASSUS, P. 2001. *Toxines d'algues dans l'alimentation*, Editions Quae.

FUENTES-PRIOR, P. & SALVESEN, G. S. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*, 384, 201-32.

-G-

GALIMANY, E., SUNILA, I., HEGARET, H., RAMON, M. & WIKFORS, G. H. 2008. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: Histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae*, 7, 702-711.

GALLUZZI, L., BRAVO-SAN PEDRO, J. M., VITALE, I., AARONSON, S. A., ABRAMS, J. M., ADAM, D., ALNEMRI, E. S., ALTUCCI, L., ANDREWS, D., ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M., BAEHRECKE, E. H., BAZAN, N. G., BERTRAND, M. J., BIANCHI, K., BLAGOSKLONNY, M. V., BLOMGREN, K., BORNER, C., BREDESEN, D. E., BRENNER, C., CAMPANELLA, M., CANDI, E., CECCONI, F., CHAN, F. K., CHANDEL, N. S., CHENG, E. H., CHIPUK, J. E., CIDLOWSKI, J. A., CIECHANOVER, A., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., DE LAURENZI, V., DE MARIA, R., DEBATIN, K. M., DI DANIELE, N., DIXIT, V. M., DYNLACHT, B. D., EL-DEIRY, W. S., FIMIA, G. M., FLAVELL, R. A., FULDA, S., GARRIDO, C., GOUGEON, M. L., GREEN, D. R., GRONEMEYER, H., HAJNOCZKY, G., HARDWICK, J. M., HENGARTNER, M. O., ICHIJO, H., JOSEPH, B., JOST, P. J., KAUFMANN, T., KEPP, O., KLIONSKY, D. J., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LEMASTERS, J. J., LEVINE, B., LINKERMANN, A., LIPTON, S. A., LOCKSHIN, R. A., LOPEZ-OTIN, C., LUGLI, E., MADEO, F., MALORNI, W., MARINE, J. C., MARTIN, S. J., MARTINOU, J. C., MEDEMA, J. P., MEIER, P., MELINO, S., MIZUSHIMA, N., MOLL, U., MUNOZ-PINEDO, C., NUNEZ, G., OBERST, A., PANARETAKIS, T., PENNINGER, J. M., PETER, M. E., PIACENTINI, M., PINTON, P., PREHN, J. H., PUTHALAKATH, H., RABINOVICH, G. A., RAVICHANDRAN, K. S., RIZZUTO, R., RODRIGUES, C. M., RUBINSZTEIN, D. C., RUDEL, T., SHI, Y., SIMON, H. U., STOCKWELL, B. R., SZABADKAI, G., TAIT, S. W., TANG, H. L., TAVERNARAKIS, N., TSUJIMOTO, Y., VANDEN BERGHE, T., VANDENABEELE, P., VILLUNGER, A., WAGNER, E. F., et al. 2015. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*, 22, 58-73.

GALLUZZI, L., MAIURI, M. C., VITALE, I., ZISCHKA, H., CASTEDO, M., ZITVOGEL, L. & KROEMER, G. 2007. Cell death modalities: classifications and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, 14, 1237-1243.

GALLUZZI, L., VITALE, I., ABRAMS, J. M., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., EL-DEIRY, W. S., FULDA, S., GOTTLIEB, E., GREEN, D. R., HENGARTNER, M. O., KEPP, O., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LIPTON, S. A., LU, X., MADEO, F., MALORNI, W.,

- MEHLEN, P., NUNEZ, G., PETER, M. E., PIACENTINI, M., RUBINSZTEIN, D. C., SHI, Y., SIMON, H. U., VANDENABEELE, P., WHITE, E., YUAN, J., ZHIVOTOVSKY, B., MELINO, G. & KROEMER, G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, 19, 107-20.
- GALTSOFF, P. S. 1964. *The american oyster Crassostrea virginica*. Gmelin., Washington, D.C: US Department of Interior.
- GAY, M., BERTHE, F. C. & LE ROUX, F. 2004a. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Organ*, 59, 49-56.
- GAY, M., RENAULT, T., PONS, A. M. & LE ROUX, F. 2004b. Two *vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis Aquat Organ*, 62, 65-74.
- GENOVESI, B., BERREBI, P., NAGAI, S., REYNAUD, N., WANG, J. & MASSERET, E. 2015. Geographic structure evidenced in the toxic dinoflagellate *Alexandrium pacificum* Litaker (*A. catenella* - group IV (Whedon & Kofoid) Balech) along Japanese and Chinese coastal waters. *Mar Pollut Bull*, 98, 95-105.
- GENOVESI, B., SHIN-GRZEBYK, M. S., GRZEBYK, D., LAABIR, M., GAGNAIRE, P. A., VAQUER, A., PASTOUREAUD, A., LASSERRE, B., COLLOS, Y., BERREBI, P. & MASSERET, E. 2011. Assessment of cryptic species diversity within blooms and cyst bank of the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae) in a Mediterranean lagoon facilitated by semi-multiplex PCR. *Journal of Plankton Research*, 33, 405-414.
- GERVAIS, O., RENAULT, T. & ARZUL, I. 2015. Induction of apoptosis by UV in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol*, 46, 232-42.
- GLIBERT, P. M., SEITZINGER, S., HEIL, C. A., BURKHOLDER, J. M., PARROW, M., CODISPOTI, L. A. & KELLY, V. 2005. The role of eutrophication in the global proliferation of harmful algal blooms. *Oceanography*, 18, p. 198-209.
- GONZALEZ, M., GUEGUEN, Y., DESSERRE, G., DE LORGERIL, J., ROMESTAND, B. & BACHERE, E. 2007. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*, 31, 332-9.
- GONZALEZ, M., ROMESTAND, B., FIEVET, J., HUVET, A., LEBART, M. C., GUEGUEN, Y. & BACHERE, E. 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 1089-97.

- GREEN, T. J., DIXON, T. J., DEVIC, E., ADLARD, R. D. & BARNES, A. C. 2009. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish Shellfish Immunol*, 26, 799-810.
- GREEN, T. J. & MONTAGNANI, C. 2013. Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 muvar). *Fish Shellfish Immunol*, 35, 382-8.
- GREEN, T. J., MONTAGNANI, C., BENKENDORFF, K., ROBINSON, N. & SPECK, P. 2014a. Ontogeny and water temperature influences the antiviral response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 36, 151-7.
- GREEN, T. J., RAFTOS, D., SPECK, P. & MONTAGNANI, C. 2015a. Antiviral immunity in marine molluscs. *J Gen Virol*, 96, 2471-82.
- GREEN, T. J., ROBINSON, N., CHATAWAY, T., BENKENDORFF, K., O'CONNOR, W. & SPECK, P. 2014b. Evidence that the major hemolymph protein of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, has antiviral activity against herpesviruses. *Antiviral Res*, 110, 168-74.
- GREEN, T. J., ROLLAND, J. L., VERGNES, A., RAFTOS, D. & MONTAGNANI, C. 2015b. OsHV-1 countermeasures to the Pacific oyster's anti-viral response. *Fish Shellfish Immunol*, 47, 435-43.
- GREEN, T. J., VERGNES, A., MONTAGNANI, C. & DE LORGERIL, J. 2016. Distinct immune responses of juvenile and adult oysters (*Crassostrea gigas*) to viral and bacterial infections. *Vet Res*, 47, 72.
- GROENEVELD, R. A., BARTELINKS, H., BORGER, T., BOSELLO, F., BUISMAN, E., DELPIAZZO, E., EBOLI, F., J.A., F., HAMON, K. G., HATTAM, C., LOUREIRO, M., NUNES, P. A. L. D., PIWOWARCZYK, J., SCHASFOORT, F. E., SIMONS, S. L. & WALKER, A. N. 2016. Economic impacts of marine ecological change: Review and recent contributions of the VECTORS project on European marine waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, in press.
- GUEGUEN, M. 2009. Modélisation de la détoxification de mollusques bivalves contenant des phycotoxines paralysantes ou diarrhéiques.
- GUEGUEN, M., BARDOUIL, M., BARON, R., LASSUS, P., TRUQUET, P., MASSARDIER, J. & AMZIL, Z. 2008a. Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquatic Living Resources*, 21, 13-20.
- GUEGUEN, M., LASSUS, P., LAABIR, M., BARDOUIL, M., BARON, R., SECHET, V., TRUQUET, P., AMZIL, Z. & BARILLE, L. 2008b. Gut passage times in two bivalve

molluscs fed toxic microalgae: *Alexandrium minutum*, *A. catenella* and *Pseudo-nitzschia calliantha*. *Aquatic Living Resources*, 21, 21-29.

GUEGUEN, Y., CADORET, J. P., FLAMENT, D., BARREAU-ROUMIGUIERE, C., GIRARDOT, A. L., GARNIER, J., HOAREAU, A., BACHERE, E. & ESCOUBAS, J. M. 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*, 303, 139-45.

GUICCIARDI, M. E., LEIST, M. & GORES, G. J. 2004. Lysosomes in cell death. *Oncogene*, 23, 2881-90.

GYRD-HANSEN, M. & MEIER, P. 2010. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer*, 10, 561-74.

-H-

HABERKORN, H., LAMBERT, C., LE GOÏC, N., MOAL, J., SUQUET, M., GUÉGUEN, M., SUNILA, I. & SOUDANT, P. 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae*, 9, 427-439.

HABERKORN, H., LAMBERT, C., LE GOIC, N., QUERE, C., BRUNEAU, A., RISO, R., AUFFRET, M. & SOUDANT, P. 2014. Cellular and biochemical responses of the oyster *Crassostrea gigas* to controlled exposures to metals and *Alexandrium minutum*. *Aquat Toxicol*, 147, 158-67.

HALLEGRAEFF, G. M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32, p. 79-99.

HALLEGRAEFF, G. M. 1995. Harmful algal blooms: A global overview. In: HALLEGRAEFF, G. M., ANDERSON, D. M. & CEMBELLA, A. D. (eds.) *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission UNESCO.

HAWKINS, A. J. S., BAYNE, B. L., BOUGRIER, S., HERAL, M., IGLESIAS, J. I. P., NAVARRO, E., SMITH, R. F. M. & URRUTIA, M. B. 1998. Some general relationships in comparing the feeding physiology of suspension-feeding bivalve molluscs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 219, 87-103.

HE, X., ZHANG, Y. & YU, Z. 2011. An Mpeg (macrophage expressed gene) from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: molecular characterization and gene expression. *Fish Shellfish Immunol*, 30, 870-6.

HE, Y., JOUAUX, A., FORD, S. E., LELONG, C., SOURDAINE, P., MATHIEU, M. & GUO, X. 2015. Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. *Fish Shellfish Immunol*, 46, 131-44.

- HEGARET, H., DA SILVA, P. M., WIKFORS, G. H., HABERKORN, H., SHUMWAY, S. E. & SOUDANT, P. 2011. In vitro interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve molluscs. *Cell Biol Toxicol*, 27, 249-66.
- HERPIN, A., BADARIOTTI, F., RODET, F. & FAVREL, P. 2004. Molecular characterization of a new leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor from a bivalve mollusc: evolutionary implications. *Biochim Biophys Acta*, 1680, 137-44.
- HERPIN, A., FAVREL, P. & CUNNINGHAM, C. 2002. Gene structure and expression of cg-ALR1, a type I activin-like receptor from the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Gene*, 301, 21-30.
- HERPIN, A., LELONG, C., BECKER, T., FAVREL, P. & CUNNINGHAM, C. 2007. A tolloid homologue from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Gene Expr Patterns*, 7, 700-8.
- HERPIN, A., LELONG, C., BECKER, T., ROSA, F., FAVREL, P. & CUNNINGHAM, C. 2005. Structural and functional evidence for a singular repertoire of BMP receptor signal transducing proteins in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggests a shared ancestral BMP/activin pathway. *FEBS J*, 272, 3424-40.
- HIBBETTS, K., HINES, B. & WILLIAMS, D. 1999. An overview of proteinase inhibitors. *J Vet Intern Med*, 13, 302-8.
- HINE, P. M. 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 9, 367-385.
- HOAGLAND, P. & SCATASTA, S. 2006. The Economic Effects of Harmful Algal Blooms. In: GRANÉLI, E. & TURNER, J. T. (eds.) *Ecology of Harmful Algae*. Berlin-Heidelberg: Springer
- HOTCHKISS, R. S., STRASSER, A., MCDUNN, J. E. & SWANSON, P. E. 2009. Cell death. *N Engl J Med*, 361, 1570-83.
- HUVET, A., HERPIN, A., DEGREMONT, L., LABREUCHE, Y., SAMAIN, J. F. & CUNNINGHAM, C. 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*, 343, 211-20.

-I-

- IGNATIADES, L., GOTSIS-SKRETAS, O. & METAXATOS, A. 2007 Field and culture studies on the ecophysiology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Halim) present in Greek coastal waters. *Harmful Algae* 6, 153-165.

- ITOH, N., OKADA, Y., TAKAHASHI, K. G. & OSADA, M. 2010. Presence and characterization of multiple mantle lysozymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 29, 126-35.
- ITOH, N. & TAKAHASHI, K. G. 2007. cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 148, 160-6.
- ITOH, N. & TAKAHASHI, K. G. 2008. Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 150, 409-17.
- ITOH, N. & TAKAHASHI, K. G. 2009. A novel peptidoglycan recognition protein containing a goose-type lysozyme domain from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mol Immunol*, 46, 1768-74.
- ITOH, N., XUE, Q. G., SCHEY, K. L., LI, Y., COOPER, R. K. & LA PEYRE, J. F. 2011. Characterization of the major plasma protein of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a proposed role in host defense. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 158, 9-22.

-J-

- JAIME, E., GERDTS, G. & LUCKAS, B. 2007. In vitro transformation of PSP toxins by different shellfish tissues. *Harmful Algae*, 6, 308-316.
- JEMAA, M., MORIN, N., CAVELIER, P., CAU, J., STRUB, J. M. & DELSERT, C. 2014. Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters. *J Exp Biol*, 217, 3067-77.
- JENKINS, C., HICK, P., GABOR, M., SPIERS, Z., FELL, S. A., GU, X., READ, A., GO, J., DOVE, M., O'CONNOR, W., KIRKLAND, P. D. & FRANCES, J. 2013. Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 micro-var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Dis Aquat Organ*, 105, 109-26.
- JEONG, H. J., PARK, J. Y., NHO, J. H., PARK M.O., J.H., H., SEONG, K. A., JENG, C., SEONG, C. N., LEE, K. Y. & YIH, W. H. 2005. Feeding by red-tide dinoflagellates on the cyanobacterium *Synechococcus*. *Aquat. Microb. Ecol*, 41.

-K-

- KAO, C. Y. 1972. Pharmacology of tetrodotoxin and saxitoxin. *Fed Proc*, 31, 1117-23.
- KAO, C. Y. 1993. *Paralytic shellfish poisoning*, Academic Press, San Diego, Falconer IR (ed).

- KATAOKA, T. 2005. The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol*, 25, 31-58.
- KELLMANN, R., MIHALI, T. K., JEON, Y. J., PICKFORD, R., POMATI, F. & NEILAN, B. A. 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 74, 4044-53.
- KEMP, C. & IMLER, J. L. 2009. Antiviral immunity in drosophila. *Curr Opin Immunol*, 21, 3-9.
- KENNEDY, V. S., NEWELL, R. I. E. & EBLE, A. F. 1996. General Anatomy. *The Eastern Oyster : Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant, College Park, MD.
- KERR, J. F. 1965. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol*, 90, 419-35.
- KERR, J. F. 2002. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 181-182, 471-4.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KIM, R., EMI, M., TANABE, K., MURAKAMI, S., UCHIDA, Y. & ARIHIRO, K. 2006. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J Pathol*, 208, 319-26.
- KOROPATNICK, T. A., ENGLE, J. T., APICELLA, M. A., STABB, E. V., GOLDMAN, W. E. & MCFALL-NGAI, M. J. 2004. Microbial factor-mediated development in a host-bacterial mutualism. *Science*, 306, 1186-8.
- KRAGOL, G., LOVAS, S., VARADI, G., CONDIE, B. A., HOFFMANN, R. & OTVOS, L., JR. 2001. The antibacterial peptide pyrrocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*, 40, 3016-26.
- KROEMER, G. 2003. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun*, 304, 433-5.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L. & BRENNER, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 87, 99-163.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., EL-DEIRY, W. S., GOLSTEIN, P., GREEN, D. R., HENGARTNER, M., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LIPTON, S. A., MALORNI, W., NUNEZ, G., PETER, M. E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B. & MELINO, G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16, 3-11.

KRUEGER, A., FAS, S. C., BAUMANN, S. & KRAMMER, P. H. 2003. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev*, 193, 58-69.

-L-

LAABIR, M., AMZIL, Z., LASSUS, P., MASSERET, E., TAPILATU, Y., DE VARGAS, R. & GRZEBYK, D. 2007. Viability, growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.*, 20, 51-57.

LAABIR, M., COLLOS, Y., MASSERET, E., GRZEBYK, D., ABADIE, E., SAVART, V., SIBAT, M. & AMZIL, Z. 2013. Influence of environmental factors on the paralytic shellfish toxin content and profile of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) isolated from the Mediterranean Sea. *Mar Drugs*, 11, 1583-601.

LAABIR, M. & GENTIEN, P. 1999. Survival of toxic dinoflagellates after gut passage in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunburg. *Journal of Shellfish Research*, 18, 217-222.

LAABIR, M., JAUZEIN, C., GENOVESI, B., MASSERET, E., GRZEBYK, D., CECCHI, P., VAQUER, A., PERRIN, Y. & COLLOS, Y. 2011. Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *Journal of Plankton Research*, 33, 1550-1563.

LAANAIA, N., VAQUER, A., FIANDRINO, A., GENOVESI, B., PASTOUREAUD, A., CECCHI, P. & COLLOS, Y. 2013. Wind and temperature controls on *Alexandrium* blooms (2000-2007) in Thau lagoon (Western Mediterranean). *Harmful Algae*, 28, 31-36.

LACOSTE, A., CUEFF, A. & POULET, S. A. 2002. P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate beta-adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cells. *J Cell Sci*, 115, 761-8.

LACOSTE, A., JALABERT, F., MALHAM, S., CUEFF, A., GELEBART, F., CORDEVANT, C., LANGE, M. & POULET, S. A. 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Organ*, 46, 139-145.

LANDSBERG, J., DOLAH, F. V. & DOUCETTE, G. 2005. Marine and estuarine harmful algal blooms: Impacts on human and animal health. In: COLWELL, B. E. (ed.) *Oceans and health: Pathogens in the marine environment*. New York: Springer.

LANDSBERG, J. H., HALL, S., JOHANNESSEN, J. N., WHITE, K. D., CONRAD, S. M., ABBOTT, J. P., FLEWELLING, L. J., RICHARDSON, R. W., DICKEY, R. W., JESTER, E. L., ETHERIDGE, S. M., DEEDS, J. R., VAN DOLAH, F. M., LEIGHFIELD, T. A., ZOU, Y., BEAUDRY, C. G., BENNER, R. A., ROGERS, P. L.,

- SCOTT, P. S., KAWABATA, K., WOLNY, J. L. & STEIDINGER, K. A. 2006. Saxitoxin puffer fish poisoning in the United States, with the first report of *Pyrodinium bahamense* as the putative toxin source. *Environ Health Perspect*, 114, 1502-7.
- LASSUDRIE, M., SOUDANT, P., NICOLAS, J. L., FABIoux, C., LAMBERT, C., MINER, P., LE GRAND, J., PETTON, B. & HEGARET, H. 2015. Interaction between toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* exposure and disease associated with herpesvirus OsHV-1 mu Var in Pacific oyster spat *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae*, 45, 53-61.
- LASSUDRIE, M., SOUDANT, P., NICOLAS, J. L., MINER, P., LE GRAND, J., LAMBERT, C., LE GOIC, N., HEGARET, H. & FABIoux, C. 2016. Exposure to the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* modulates juvenile oyster *Crassostrea gigas* hemocyte variables subjected to different biotic conditions. *Fish Shellfish Immunol*, 51, 104-15.
- LASSUS, P., BARDOUIL, M., BARON, R., BERARD, J. B., MASSELIN, P., TRUQUET, P. & PITRAT, J. P. 2005. Improving detoxification efficiency of PSP contaminated oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture Europe*, 3-6.
- LASSUS, P., BARDOUIL, M., BELIAEFF, B., MASSELIN, P., NAVINER, M. & TRUQUET, P. 1999. Effect of a continuous supply of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim on the feeding behavior of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Journal of Shellfish Research* 18, 211-216.
- LASSUS, P., BARDOUIL, M., MASSELIN, P., NAVINER, M. & TRUQUET, P. 2000. Comparative efficiencies of different non-toxic microalgal diets in detoxification of PSP-contaminated oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J Nat Toxins*, 9, 1-12.
- LASSUS, P., BARON, R., GAREN, P., TRUQUET, P., MASSELIN, P., BARDOUIL, M., LEGUAY, D. & AMZIL, Z. 2004. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penze estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources*, 17, 207-214.
- LE GALL, S., HASSEN, M. B. & LE GALL, P. 1997. Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster *Crassostrea gigas*: protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension-feeders. *Marine Ecology Progress Series*, 152, 301-306.
- LE MOULLAC, G., QUEAU, I., LE SOUCHU, P., POUVREAU, S., MOAL, J., LE COZ, J. R. & SAMAIN, J. F. 2009. Metabolic adjustments in the oyster according to oxygen level and temperature. *Marine Biology Research*, 3, 357-366.
- LE QUERE, H., HERPIN, A., HUVET, A., LELONG, C. & FAVREL, P. 2009. Structural and functional characterizations of an Activin type II receptor orthologue from the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Gene*, 436, 101-7.

- LE ROUX, F., BINESSE, J., SAULNIER, D. & MAZEL, D. 2007. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector. *Appl Environ Microbiol*, 73, 777-84.
- LELONG, C., BADARIOTTI, F., LE QUERE, H., RODET, F., DUBOS, M. P. & FAVREL, P. 2007. Cg-TGF-beta, a TGF-beta/activin homologue in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against Gram-negative microbial infection. *Dev Comp Immunol*, 31, 30-8.
- LELONG, C., MATHIEU, M. & FAVREL, P. 2000. Structure and expression of mGDF, a new member of the transforming growth factor-beta superfamily in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Eur J Biochem*, 267, 3986-93.
- LELONG, C., MATHIEU, M. & FAVREL, P. 2001. Identification of new bone morphogenetic protein-related members in invertebrates. *Biochimie*, 83, 423-6.
- LEMIRE, A., GOUDENEGE, D., VERSIGNY, T., PETTON, B., CALTEAU, A., LABREUCHE, Y. & LE ROUX, F. 2015. Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J*, 9, 1523-31.
- LEVINTON, J. S., WARD, J. E. & SHUMWAY, S. E. 2002. Feeding responses of the bivalves *Crassostrea gigas* and *Mytilus trossulus* to chemical composition of fresh and aged kelp detritus. *Marine Biology Research*, 141, 367-376.
- LI, C., QU, T., HUANG, B., JI, P., HUANG, W., QUE, H., LI, L. & ZHANG, G. 2015. Cloning and characterization of a novel caspase-8-like gene in *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 46, 486-92.
- LI, H., ZHU, H., XU, C. J. & YUAN, J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94, 491-501.
- LI, J., ZHANG, Y., XIANG, Z., TONG, Y., QU, F. & YU, Z. 2014. Genomic characterization and expression analysis of five novel IL-17 genes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 40, 455-65.
- LI, J., ZHANG, Y., XIANG, Z., XIAO, S., YU, F. & YU, Z. 2013. High mobility group box 1 can enhance NF-kappaB activation and act as a pro-inflammatory molecule in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 35, 63-70.
- LI, L. Y., LUO, X. & WANG, X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412, 95-9.
- LI, M., QIU, L., WANG, L., WANG, W., XIN, L., LI, Y., LIU, Z. & SONG, L. 2016a. The inhibitory role of gamma-aminobutyric acid (GABA) on immunomodulation of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 52, 16-22.

- LI, Y., ZHANG, L., QU, T., LI, L. & ZHANG, G. 2016b. Characterization of Oyster Voltage-Dependent Anion Channel 2 (VDAC2) Suggests Its Involvement in Apoptosis and Host Defense. *PLoS One*, 11, e0146049.
- LILLY, E. L., KULIS, D. M., GENTIEN, P. & ANDERSON, D. M. 2002. Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *Journal of Plankton Research*, 24, 443-452.
- LIN, H. P., CHO, Y., YASHIRO, H., YAMADA, T. & OSHIMA, Y. 2004. Purification and characterization of paralytic shellfish toxin transforming enzyme from *Macra chinensis*. *Toxicon*, 44, 657-68.
- LIPART, C. & RENAULT, T. 2002. Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *J Virol Methods*, 101, 1-10.
- LIU, C., JIANG, S., WANG, M., WANG, L., CHEN, H., XU, J., LV, Z. & SONG, L. 2016a. A novel siglec (CgSiglec-1) from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) with broad recognition spectrum and inhibitory activity to apoptosis, phagocytosis and cytokine release. *Dev Comp Immunol*, 61, 136-44.
- LIU, Z., WANG, L., ZHOU, Z., SUN, Y., WANG, M., WANG, H., HOU, Z., GAO, D., GAO, Q. & SONG, L. 2016b. The simple neuroendocrine-immune regulatory network in oyster *Crassostrea gigas* mediates complex functions. *Sci Rep*, 6, 26396.
- LU, R., MADURO, M., LI, F., LI, H. W., BROITMAN-MADURO, G., LI, W. X. & DING, S. W. 2005. Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 436, 1040-3.
- LUO, X., BUDIHardJO, I., ZOU, H., SLAUGHTER, C. & WANG, X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94, 481-90.

-M-

- MARTENOT, C., SEGARRA, A., BAILLON, L., FAURY, N., HOUSSIN, M. & RENAULT, T. 2016. In situ localization and tissue distribution of ostreid herpesvirus 1 proteins in infected Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol*, 136, 124-35.
- MARTINS, L. M., IACCARINO, I., TENEV, T., GSCHMEISSNER, S., TOTTY, N. F., LEMOINE, N. R., SAVOPOULOS, J., GRAY, C. W., CREASY, C. L., DINGWALL, C. & DOWNWARD, J. 2002. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem*, 277, 439-44.

- MARZO, I., BRENNER, C., ZAMZAMI, N., SUSIN, S. A., BEUTNER, G., BRDICZKA, D., REMY, R., XIE, Z. H., REED, J. C. & KROEMER, G. 1998. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med*, 187, 1261-71.
- MASSELIN, P., AMZIL, Z., ABADIE, E., NÉZAN, E., LE BEC, C., CHIANTELLA, C. & TRUQUET, P. 2000. Paralytic shellfish poisoning on the French Mediterranean coast in the autumn 1988: *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae) as causative agent.
- MATSUMOTO, T., NAKAMURA, A. M. & TAKAHASHI, K. G. 2006. Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 145, 325-30.
- MATZINGER, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 296, 301-5.
- MEDHIOUB, W., RAMONDENC, S., VANHOVE, A. S., VERGNES, A., MASSERET, E., SAVAR, V., AMZIL, Z., LAABIR, M. & ROLLAND, J. L. 2013. Exposure to the Neurotoxic Dinoflagellate, *Alexandrium catenella*, Induces Apoptosis of the Hemocytes of the Oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar Drugs*, 11, 4799-4814.
- MEDZHITOV, R. & JANEWAY, C. A., JR. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, 296, 298-300.
- MÉLÉDER, V., BARILLÉ-BOYER, A. L., BAUD, J. P., BARILLÉ, L., COGNIE, B. & ROSA, P. 2001. Modélisation de l'affinage de l'hôte *Crassostrea gigas* alimentée avec la diatomée *Skeletonema costatum*. *Aquat. Living Resour*, 14, 1-16.
- MELLO, D. F., DA SILVA, P. M., BARRACCO, M. A., SOUDANT, P. & HEGARET, H. 2013. Effects of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* and its toxin (saxitoxin) on the functional activity and gene expression of *Crassostrea gigas* hemocytes. *Harmful Algae*, 26, 45-51.
- MIRAMAR, M. D., COSTANTINI, P., RAVAGNAN, L., SARAIVA, L. M., HAOUZI, D., BROTHERS, G., PENNINGER, J. M., PELEATO, M. L., KROEMER, G. & SUSIN, S. A. 2001. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem*, 276, 16391-8.
- MODJTAHEDI, N., GIORDANETTO, F., MADEO, F. & KROEMER, G. 2006. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol*, 16, 264-72.
- MOGENSEN, T. H. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*, 22, 240-73, Table of Contents.
- MONTAGNANI, C., AVARRE, J. C., DE LORGERIL, J., QUIQUAND, M., BOULO, V. & ESCOUBAS, J. M. 2007. First evidence of the activation of Cg-timp, an immune

response component of Pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Developmental and Comparative Immunology*, 31, 1-11.

MONTAGNANI, C., KAPPLER, C., REICHHART, J. M. & ESCOUBAS, J. M. 2004. Cg-Rel, the first Rel/NF-kappaB homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Lett*, 561, 75-82.

MONTAGNANI, C., LABREUCHE, Y. & ESCOUBAS, J. M. 2008. Cg-IkappaB, a new member of the IkappaB protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*, 32, 182-90.

MONTAGNANI, C., LE ROUX, F., BERTHE, F. & ESCOUBAS, J. M. 2001. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms(1). *FEBS Lett*, 500, 64-70.

MONTRESOR, M., NUZZO, L. & MAZZOCCHI, M. G. 2003. Viability of dinoflagellate cysts after the passage through the copepod gut *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 287, 209-221.

-N-

NARAHASHI, T. 1972. Mechanism of action of tetrodotoxin and saxitoxin on excitable membranes. *Fed Proc*, 31, 1124-32.

NORBERG, E., GOGVADZE, V., OTT, M., HORN, M., UHLEN, P., ORRENIUS, S. & ZHIVOTOVSKY, B. 2008. An increase in intracellular Ca²⁺ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. *Cell Death Differ*, 15, 1857-64.

NYHOLM, S. V. & GRAF, J. 2012. Knowing your friends: invertebrate innate immunity fosters beneficial bacterial symbioses. *Nat Rev Microbiol*, 10, 815-27.

-O-

OLAFSEN, J. A., FLETCHER, T. C. & GRANT, P. T. 1992. Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev Comp Immunol*, 16, 123-38.

ORTON, J. H. 1923. Summary of an account of investigations into the cause or causes of the unusual mortality among oysters in english oyster beds during 1920 and 1921. *Journal of Marine Biology Association UK*, 13, 1-23.

OSHIMA, Y. 1995 Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. , Lavoisier Publishine ILP (ed) .Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou-Le baut, C.

OTERA, H., OHSAKAYA, S., NAGAURA, Z., ISHIHARA, N. & MIHARA, K. 2005. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J*, 24, 1375-86.

-P-

PALMER, R. E. & WILLIAMS, R. E. 1980. Effect of particle concentration on filtration efficiency of the bay scallop *Argopecten irradians* and the oyster *Crassostrea virginica*. *Ophelia*, 19, 163-174.

PARK, C. B., KIM, H. S. & KIM, S. C. 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun*, 244, 253-7.

PARK, E. M., KIM, Y. O., NAM, B. H., KONG, H. J., KIM, W. J., LEE, S. J., KONG, I. S. & CHOI, T. J. 2008. Cloning, characterization and expression analysis of the gene for a putative lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 24, 11-7.

PATRZYKAT, A., FRIEDRICH, C. L., ZHANG, L., MENDOZA, V. & HANCOCK, R. E. 2002. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in Escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 605-14.

PETTON, B., BRUTO, M., JAMES, A., LABREUCHE, Y., ALUNNO-BRUSCIA, M. & LE ROUX, F. 2015. *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Front Microbiol*, 6, 686.

PITCHER, G. C., FANCO, J. M., DOUCETTE, G. J., POWELL, C. L. & MOUTON, A. 2001. Paralytic shellfish poisoning in the abalone *Haliotis midae* on the west coast of South Africa. *Journal of Shellfish Research*, 20, 895-904.

POIRIER, A. C., SCHMITT, P., ROSA, R. D., VANHOVE, A. S., KIEFFER-JAQUINOD, S., RUBIO, T. P., CHARRIERE, G. M. & DESTOUMIEUX-GARZON, D. 2014. Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas*. *J Biol Chem*, 289, 24821-31.

POMATI, F., SACCHI, S., ROSSETTI, C., GIOVANNARDI, S., ONODERA, H., OSHIMA, Y. & NEILAN, B. A. 2000. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. . *Journal of Phycology* 36, 553-562.

POP, C. & SALVESEN, G. S. 2009. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem*, 284, 21777-81.

PRAKASH, A., MEDCOF, J. C. & TENNANT, A. D. 1971. Paralytic shellfish poisoning in Eastern Canada. . *Bull. Fish. Res. Board Canada.*, 117, 1-88.

-Q-

QU, T., HUANG, B., ZHANG, L., LI, L., XU, F., HUANG, W., LI, C., DU, Y. & ZHANG, G. 2014. Identification and functional characterization of two executioner caspases in *Crassostrea gigas*. *PLoS One*, 9, e89040.

QU, T., ZHANG, L., WANG, W., HUANG, B., LI, Y., ZHU, Q., LI, L. & ZHANG, G. 2015. Characterization of an inhibitor of apoptosis protein in *Crassostrea gigas* clarifies its role in apoptosis and immune defense. *Dev Comp Immunol*, 51, 74-8.

-R-

RAUTUREAU, G. J., DAY, C. L. & HINDS, M. G. 2010. Intrinsically disordered proteins in bcl-2 regulated apoptosis. *Int J Mol Sci*, 11, 1808-24.

RENAULT, T., FAURY, N., BARBOSA-SOLOMIEU, V. & MOREAU, K. 2011. Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Dev Comp Immunol*, 35, 725-35.

RENAULT, T., LE DEUFF, R. M., CHOLLET, B., COCHENNEC, N. & GERARD, A. 2000. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Dis Aquat Organ*, 42, 173-83.

RITCHIE, J. M., BLACK, J. A., WAXMAN, S. G. & ANGELIDES, K. J. 1990. Sodium channels in the cytoplasm of Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9290-4.

ROBERTS, S., GOETZ, G., WHITE, S. & GOETZ, F. 2009. Analysis of genes isolated from plated hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol (NY)*, 11, 24-44.

ROBERTS, S., GUEGUEN, Y., DE LORGERIL, J. & GOETZ, F. 2008. Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure. *Dev Comp Immunol*, 32, 1099-104.

ROLLAND, J. L., MEDHIOUB, W., VERGNES, A., ABI-KHALIL, C., SAVAR, V., ABADIE, E., MASSERET, E., AMZIL, Z. & LAABIR, M. 2014. A feedback mechanism to control

apoptosis occurs in the digestive gland of the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the paralytic shellfish toxins producer *Alexandrium catenella*. *Mar Drugs*, 12, 5035-54.

ROLLAND, J. L., PELLETIER, K., MASSERET, E., RIEUVILLENEUVE, F., SAVAR, V., SANTINI, A., AMZIL, Z. & LAABIR, M. 2012. Paralytic Toxins Accumulation and Tissue Expression of alpha-Amylase and Lipase Genes in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Fed with the Neurotoxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Mar Drugs*, 10, 2519-2534.

ROMERO, A., NOVOA, B. & FIGUERAS, A. 2015. The complexity of apoptotic cell death in mollusks: An update. *Fish Shellfish Immunol*, 46, 79-87.

ROSA, R. D., SANTINI, A., FIEVET, J., BULET, P., DESTOUMIEUX-GARZON, D. & BACHERE, E. 2011. Big defensins, a diverse family of antimicrobial peptides that follows different patterns of expression in hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One*, 6, e25594.

RUBARTELLI, A. & LOTZE, M. T. 2007. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol*, 28, 429-36.

-S-

SAELEN, X., FESTJENS, N., VANDE WALLE, L., VAN GURP, M., VAN LOO, G. & VANDENABEELE, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23, 2861-74.

SAGOU, R., AMANHIR, R., TALEB, H., VALE, P., BLAGHEN, M. & LOUTFI, M. 2005. Comparative study on differential accumulation of PSP toxins between cockle (*Acanthocardia tuberculatum*) and sweet clam (*Callista chione*). *Toxicon*, 46, 612-8.

SAKER, M. L., NOGUEIRA, I. C., VASCONCELOS, V. M., NEILAN, B. A., EAGLESHAM, G. K. & PEREIRA, P. 2003. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol Environ Saf*, 55, 243-50.

SALVESEN, G. S. & DIXIT, V. M. 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 10964-7.

SAMAIN, J. F. & MCCOMBIE, H. 2008. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Versailles.

SAMEJIMA, K., TONE, S. & EARNSHAW, W. C. 2001. CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 45427-32.

- SANSEVERINO, I., CONDUTO, D., POZZOLI, P., DOBRICIC, S. & LETTIERI, T. 2016. Algal bloom and its economic impact. *EUR 27905 EN*; doi:10.2788/660478.
- SATO, S., SAKAI, R. & KODAMA, M. 2000. Identification of thioether intermediates in the reductive transformation of gonyautoxins into saxitoxins by thiols. *Bioorg Med Chem Lett*, 10, 1787-9.
- SAULNIER, D., DE DECKER, S. & HAFFNER, P. 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. *J Microbiol Methods*, 77, 191-7.
- SAULNIER, D., DE DECKER, S., HAFFNER, P., COBRET, L., ROBERT, M. & GARCIA, C. 2010. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microb Ecol*, 59, 787-98.
- SAYFRITZ, S. J., AASEN, J. A. & AUNE, T. 2008. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection. *Toxicon*, 52, 330-40.
- SCHIKORSKI, D., FAURY, N., PEPIN, J. F., SAULNIER, D., TOURBIEZ, D. & RENAULT, T. 2011a. Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res*, 155, 28-34.
- SCHIKORSKI, D., RENAULT, T., SAULNIER, D., FAURY, N., MOREAU, P. & PEPIN, J. F. 2011b. Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet Res*, 42, 27.
- SCHMITT, P., DE LORGERIL, J., GUEGUEN, Y., DESTOUMIEUX-GARZON, D. & BACHERE, E. 2012a. Expression, tissue localization and synergy of antimicrobial peptides and proteins in the immune response of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*, 37, 363-70.
- SCHMITT, P., DUPERTHUY, M., MONTAGNANI, C., BACHÈRE, E. & DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. 2012b. Immune responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. An overview with focus on summer mortalities. In: QIN, J. (ed.) *Oysters: Physiology, Ecological Distribution and Mortality*. New York, USA: Nova Science Publishers Inc.
- SCHMITT, P., GUEGUEN, Y., DESMARAIS, E., BACHERE, E. & DE LORGERIL, J. 2010. Molecular diversity of antimicrobial effectors in the oyster *Crassostrea gigas*. *BMC Evol Biol*, 10, 23.
- SCHRODER, M. 2006. The unfolded protein response. *Mol Biotechnol*, 34, 279-90.

- SCHULENBURG, H., BOENISCH, C. & MICHIELS, N. K. 2007. How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? *Mol Immunol*, 44, 3338-44.
- SCOTTI, P. D., DEARING, S. C. & GREENWOOD, D. R. 2007. Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *NZ J Mar Freshwater Res*, 41.
- SEGARRA, A., BAILLON, L., FAURY, N., TOURBIEZ, D. & RENAULT, T. 2015. Detection and distribution of ostreid herpesvirus 1 in experimentally infected Pacific oyster spat. *J Invertebr Pathol*, 133, 59-65.
- SEGARRA, A., MAUDUIT, F., FAURY, N., TRANCART, S., DEGREMONT, L., TOURBIEZ, D., HAFFNER, P., BARBOSA-SOLOMIEU, V., PEPIN, J. F., TRAVERS, M. A. & RENAULT, T. 2014. Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC Genomics*, 15, 580.
- SEGARRA, A., PEPIN, J. F., ARZUL, I., MORGA, B., FAURY, N. & RENAULT, T. 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research*, 153, 92-9.
- SEO, J. K., LEE, M. J., NAM, B. H. & PARK, N. G. 2013. cgMolluscidin, a novel dibasic residue repeat rich antimicrobial peptide, purified from the gill of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 35, 480-8.
- SEO, J. K., STEPHENSON, J. & NOGA, E. J. 2011. Multiple antibacterial histone H2B proteins are expressed in tissues of American oyster. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 158, 223-9.
- SEURONT, L., VINCENT, D. & MITCHELL, J. G. 2006. Biologically induced modification of seawater viscosity in the Eastern English Channel during a *Phaeocystis globosa* spring bloom. *Journal of Marine Systems*, 61, 118-133.
- SILVERT, W. L. & CEMBELLA, A. D. 1995. Dynamic modeling of phycotoxin kinetics in the blue mussel, *Mytilus edulis*, with implication for other marine-invertebrates. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 521-531.
- SLEE, E. A., ADRAIN, C. & MARTIN, S. J. 1999. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6, 1067-74.
- SMAYDA, T. J. 1997. What is a bloom? A commentary. *Limnology and Oceanography*, 42, 1132-1136.

- SMINIA, T. & VAN DER KNAAP, W. P. 1987. Cells and molecules in molluscan immunology. *Dev Comp Immunol*, 11, 17-28.
- SMITH, E. A., GRANT, F., FERGUSON, C. M. & GALLACHER, S. 2001. Biotransformations of paralytic shellfish toxins by bacteria isolated from bivalve molluscs. *Appl Environ Microbiol*, 67, 2345-53.
- SOKOLOVA, I. M. 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. *Isj-Invertebrate Survival Journal*, 6, 49-58.
- SOKOLOVA, I. M., EVANS, S. & HUGHES, F. M. 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *J Exp Biol*, 207, 3369-80.
- SOUCHU, P., GASC, A., COLLOS, Y., VAQUER, A., TOURNIER, H., BIBENT, B. & DESLOUS-PAOLI, J. M. 1998. Biogeochemical aspects of bottom anoxia in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 164 135-146.
- SRINIVASAN, S., BEEMA SHAFREEN, R. M., NITHYANAND, P., MANISANKAR, P. & PANDIAN, S. K. 2010. Synthesis and in vitro antimicrobial evaluation of novel fluoroquinolone derivatives. *Eur J Med Chem*, 45, 6101-5.
- STOBO, L. A., LACAZE, J. P., SCOTT, A. C., PETRIE, J. & TURRELL, E. A. 2008. Surveillance of algal toxins in shellfish from Scottish waters. *Toxicon*, 51, 635-48.
- SULLIVAN, J. M., SWIFT, E., DONAGHAY, P. L. & RINES, J. E. B. 2003. Small-scale turbulence affects the division rate and morphology of two red-tide dinoflagellates. *Harmful Algae*, 2, p. 183-199.
- SUN, Y., ZHOU, Z., WANG, L., YANG, C., JIANGA, S. & SONG, L. 2014. The immunomodulation of a novel tumor necrosis factor (CgTNF-1) in oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*, 45, 291-9.
- SUSIN, S. A., LORENZO, H. K., ZAMZAMI, N., MARZO, I., SNOW, B. E., BROTHERS, G. M., MANGION, J., JACOTOT, E., COSTANTINI, P., LOEFFLER, M., LAROCLETTE, N., GOODLETT, D. R., AEBERSOLD, R., SIDEROVSKI, D. P., PENNINGER, J. M. & KROEMER, G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397, 441-6.
- SUZUKI, T., ICHIMI, I., OSHIMA, Y. & KAMIYAMA, T. 2003. Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin profiles and short-term detoxification kinetics in mussels *Mytilus galloprovincialis* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae*, 2, 201-206.

-T-

- TAATJES, D. J., SOBEL, B. E. & BUDD, R. C. 2008. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol*, 129, 33-43.
- TAKAHASHI, K. G. & MORI, K. 2000. Functional profiles of hemocytes in the bio-defense process of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku J Agric Res*, 51, 15-27.
- TANGUY, A., GUO, X. & FORD, S. E. 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene*, 338, 121-31.
- TAYLOR, F. J. R. 1980. On dinoflagellate evolution. *Biosystems*, 13, 65-108.
- TAYLOR, R. C., CULLEN, S. P. & MARTIN, S. J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 231-41.
- TERAHARA, K., TAKAHASHI, K. G. & MORI, K. 2003. Apoptosis by RGD-containing peptides observed in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*, 27, 521-8.
- TERAHARA, K., TAKAHASHI, K. G. & MORI, K. 2005. Pacific oyster hemocytes undergo apoptosis following cell-adhesion mediated by integrin-like molecules. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 141, 215-22.
- TERAHARA, K., TAKAHASHI, K. G., NAKAMURA, A., OSADA, M., YODA, M., HIROI, T., HIRASAWA, M. & MORI, K. 2006. Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster "*Crassostrea gigas*". *Dev Comp Immunol*, 30, 667-83.
- TIRAPE, A., BACQUE, C., BRIZARD, R., VANDENBULCKE, F. & BOULO, V. 2007. Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev Comp Immunol*, 31, 859-73.
- TWAROG, B. M., HIDAKA, T. & YAMAGUCHI, H. 1972. Resistance to tetrodotoxin and saxitoxin in nerves of bivalve molluscs. A possible correlation with paralytic shellfish poisoning. *Toxicon*, 10, 273-8.

-V-

- VALE, P. 2008. Complex profiles of hydrophobic paralytic shellfish poisoning compounds in *Gymnodinium catenatum* identified by liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1195, 85-93.

- VAN APELDOORN, M. E., VAN EGMOND, H. P., SPEIJERS, G. J. A. & BAKKER, G. J. I. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 7-60.
- VAN DOLAH, F. M. 2000. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environ Health Perspect*, 108 Suppl 1, 133-41.
- VAN LOO, G., SCHOTTE, P., VAN GURP, M., DEMOL, H., HOORELBEKE, B., GEVAERT, K., RODRIGUEZ, I., RUIZ-CARRILLO, A., VANDEKERCKHOVE, J., DECLERCQ, W., BEYAERT, R. & VANDENABEELE, P. 2001. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ*, 8, 1136-42.
- VANHOVE, A. S., DUPERTHUY, M., CHARRIERE, G. M., LE ROUX, F., GOUDENEGE, D., GOURBAL, B., KIEFFER-JAQUINOD, S., COUTE, Y., WAI, S. N. & DESTOUMIEUX-GARZON, D. 2015. Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environ Microbiol*, 17, 1152-65.
- VANHOVE, A. S., RUBIO, T. P., NGUYEN, A. N., LEMIRE, A., ROCHE, D., NICOD, J., VERGNES, A., POIRIER, A. C., DISCONZI, E., BACHERE, E., LE ROUX, F., JACQ, A., CHARRIERE, G. M. & DESTOUMIEUX-GARZON, D. 2016. Copper homeostasis at the host vibrio interface: lessons from intracellular vibrio transcriptomics. *Environ Microbiol*, 18, 875-88.
- VERHAGEN, A. M., EKERT, P. G., PAKUSCH, M., SILKE, J., CONNOLLY, L. M., REID, G. E., MORITZ, R. L., SIMPSON, R. J. & VAUX, D. L. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102, 43-53.

-W-

- WANG, Q., CAO, R., NING, X., YOU, L., MU, C., WANG, C., WEI, L., CONG, M., WU, H. & ZHAO, J. 2016. Effects of ocean acidification on immune responses of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 49, 24-33.
- WILMES, M., CAMMUE, B. P., SAHL, H. G. & THEVISSSEN, K. 2011. Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. *Nat Prod Rep*, 28, 1350-8.
- WRZESIEN-KUS, A., SMOLEWSKI, P., SOBCZAK-PLUTA, A., WIERZBOWSKA, A. & ROBAK, T. 2004. The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. *Apoptosis*, 9, 705-15.
- WYLLIE, A. H., KERR, J. F. R. & CURRIE, A. R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68, 251-306.

-X-

- XU, J., JIANG, S., LI, Y., LI, M., CHENG, Q., ZHAO, D., YANG, B., JIA, Z., WANG, L. & SONG, L. 2016. Caspase-3 serves as an intracellular immune receptor specific for lipopolysaccharide in oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*, 61, 1-12.
- XUE, Q., HELLBERG, M. E., SCHEY, K. L., ITOH, N., EYTAN, R. I., COOPER, R. K. & LA PEYRE, J. F. 2010. A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. *BMC Evol Biol*, 10, 213.

-Y-

- YAMAURA, K., TAKAHASHI, K. G. & SUZUKI, T. 2008. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 149, 168-75.
- YE, H., CANDE, C., STEPHANOU, N. C., JIANG, S., GURBUXANI, S., LAROCLETTE, N., DAUGAS, E., GARRIDO, C., KROEMER, G. & WU, H. 2002. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol*, 9, 680-4.
- YU, F. H., YAROV-YAROVVOY, V., GUTMAN, G. A. & CATTERALL, W. A. 2005. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev*, 57, 387-95.

-Z-

- ZHANG, G., FANG, X., GUO, X., LI, L., LUO, R., XU, F., YANG, P., ZHANG, L., WANG, X., QI, H., XIONG, Z., QUE, H., XIE, Y., HOLLAND, P. W., PAPS, J., ZHU, Y., WU, F., CHEN, Y., WANG, J., PENG, C., MENG, J., YANG, L., LIU, J., WEN, B., ZHANG, N., HUANG, Z., ZHU, Q., FENG, Y., MOUNT, A., HEDGECOCK, D., XU, Z., LIU, Y., DOMAZET-LOSO, T., DU, Y., SUN, X., ZHANG, S., LIU, B., CHENG, P., JIANG, X., LI, J., FAN, D., WANG, W., FU, W., WANG, T., WANG, B., ZHANG, J., PENG, Z., LI, Y., LI, N., CHEN, M., HE, Y., TAN, F., SONG, X., ZHENG, Q., HUANG, R., YANG, H., DU, X., CHEN, L., YANG, M., GAFFNEY, P. M., WANG, S., LUO, L., SHE, Z., MING, Y., HUANG, W., HUANG, B., ZHANG, Y., QU, T., NI, P., MIAO, G., WANG, Q., STEINBERG, C. E., WANG, H., QIAN, L., LIU, X. & YIN, Y. 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490, 49-54.

- ZHANG, L., LI, L., GUO, X., LITMAN, G. W., DISHAW, L. J. & ZHANG, G. 2015. Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Sci Rep*, 5, 8693.
- ZHANG, L., LI, L. & ZHANG, G. 2011a. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish Shellfish Immunol*, 30, 653-60.
- ZHANG, L., LI, L. & ZHANG, G. 2011b. Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Developmental and Comparative Immunology*, 35, 603-10.
- ZHANG, Y., HE, X., LI, X., FU, D., CHEN, J. & YU, Z. 2011c. The second bactericidal permeability increasing protein (BPI) and its revelation of the gene duplication in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 30, 954-63.
- ZHANG, Y., HE, X., YU, F., XIANG, Z., LI, J., THORPE, K. L. & YU, Z. 2013. Characteristic and functional analysis of toll-like receptors (TLRs) in the lophotrocozoan, *Crassostrea gigas*, reveals ancient origin of TLR-mediated innate immunity. *PLoS One*, 8, e76464.
- ZHANG, Y., HE, X. & YU, Z. 2011d. Two homologues of inhibitor of NF-kappa B (IkappaB) are involved in the immune defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 30, 1354-61.
- ZHAO, M., ANTUNES, F., EATON, J. W. & BRUNK, U. T. 2003. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem*, 270, 3778-86.

ANNEXE :

**A Feedback Mechanism to Control Apoptosis Occurs in the
Digestive Gland of the Oyster *Crassostrea gigas* Exposed to the
Paralytic Shellfish Toxins Producer *Alexandrium catenella***

Article

A Feedback Mechanism to Control Apoptosis Occurs in the Digestive Gland of the Oyster *Crassostrea gigas* Exposed to the Paralytic Shellfish Toxins Producer *Alexandrium catenella*

Jean-Luc Rolland ^{1,*}, Walid Medhioub ², Agnes Vergnes ¹, Celina Abi-khalil ¹, Véronique Savar ³, Eric Abadie ⁴, Estelle Masseret ¹, Zouher Amzil ³ and Mohamed Laabir ¹

¹ IFREMER, Université Montpellier 2, Centre National de la Recherche Scientifique, IRD, UM1, UMR 5119 “Ecologie des Systèmes Marins Côtiers”, Place E. Bataillon, CC93, Montpellier cedex 5 34095, France; E-Mails: agnes.vergnes@ifremer.fr (A.V.); celina.abikhalil@univ-montp2.fr (C.A.); estelle.masseret@univ-montp2.fr (E.M.); mohamed.laabir@univ-montp2.fr (M.L.)

² INSTM, Institut National des Sciences et Technologies de la Mer, Laboratoire d’Aquaculture, 28 rue du 2 mars 1934, Salammbô 2025, Tunisia; E-Mail: medhwalid@yahoo.fr

³ IFREMER, Laboratoire Phycotoxines (PHYC), Rue de l’Île d’Yeu BP 21105, Nantes Cedex 3 44311, France; E-Mails: veronique.savar@ifremer.fr (V.S.); zouher.amzil@ifremer.fr (Z.A.)

⁴ IFREMER, Département des laboratoires côtiers Environnement littoral et Ressources aquacoles (LER-LR), Avenue Jean Monnet, BP 171, Sète Cedex 34203, France; E-Mail: eric.abadie@ifremer.fr

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jean.luc.rolland@ifremer.fr; Tel.: +33-467-144-709; Fax: +33-467-144-622.

Received: 20 June 2014; in revised form: 1 September 2014 / Accepted: 11 September 2014 /

Published: 25 September 2014

Abstract: To better understand the effect of Paralytic Shellfish Toxins (PSTs) accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, we experimentally exposed individual oysters for 48 h to a PSTs producer, the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. In comparison to the effect of the non-toxic *Alexandrium tamarense*, on the eight apoptotic related genes tested, Bax and BI.1 were significantly upregulated in oysters exposed 48 h to *A. catenella*. Among the five detoxification related genes tested, the expression of cytochrome P450 (CYP1A) was shown to be correlated with toxin concentration in the digestive gland of oysters exposed to the toxic dinoflagellate. Beside this, we observed a significant increase in ROS production, a decrease in caspase-3/7 activity and normal percentage of apoptotic cells in this tissue. Taken together, these results suggest a feedback mechanism, which may occur in the digestive gland where BI.1 could

play a key role in preventing the induction of apoptosis by PSTs. Moreover, the expression of CYP1A, Bax and Bcl.1 were found to be significantly correlated to the occurrence of natural toxic events, suggesting that the expression of these genes together could be used as biomarker to assess the biological responses of oysters to stress caused by PSTs.

Keywords: shellfish; toxin; biomarker; expression; phytoplankton

1. Introduction

The Pacific oyster *Crassostrea gigas*, like many other bivalve mollusks, is a filter feeder that consumes microphytoplankton, including toxic dinoflagellates when they occurred. Paralytic Shellfish Toxins (PSTs) are naturally produced by some cyanobacteria and a number of toxic dinoflagellate species including *Alexandrium catenella*, *Alexandrium minutum*, *Alexandrium tamarense*, *Pyrodinium bahamense* and *Gymnodinium catenatum* [1–3]. Saxitoxin and its congeners can be divided into three categories: the carbamate compounds, which include Saxitoxin, neo-Saxitoxin and Gonyautoxins 1–4; the *N*-sulfocarbamoyl compounds, which include the C and B toxins; and the decarbamoyl compounds. Saxitoxin is one of the most potent and deadly toxins in the world and was shown to be a highly selective blocker of Na⁺ channels in excitable cells, thereby affecting nerve impulse generation [4] and can lead, in extreme cases, to human death [5]. *In situ*, oysters feeding on toxic dinoflagellates accumulate PSTs. When concentration exceeds the sanitary threshold (800 µg saxitoxin equiv/kg wet weights) farms are closed resulting in economic losses [6].

Several studies have described deleterious effects of PSTs on physiological and cellular processes in oysters including filtration activity reduction [7], oxygen consumption change [8], pseudo-feces production decrease [9], metabolic rate increase [10], reproductive development anomalies [11], alteration in feeding and digestive capacity [12–16], and modulation of gene expression [17]. Moreover, immune cell alteration has been reported including an adhesion alteration, phagocytosis inhibition [18,19], and apoptosis [20].

Few data are available on the effect of PSTs on the digestive gland. PSTs can accumulate in the DG [7,21] and are able to induce modulation of the expression of key genes (α -amylase and triacylglycerol lipase B) involved in the digestive process [16]. No other effects were observed suggesting complex mechanisms occurring in this tissue. In the present study we investigate specific relationships between PSTs accumulation and metabolic process that occur on the digestive gland of *C. gigas* exposed to toxic strain of *A. catenella* in comparison with non-toxic *A. tamarense*. To do this, the temporal expressions of 5 putative related genes known to be involved in detoxification processes and eight key genes known to be involved in apoptosis were determined. These genes were previously identified from the 210,895 ESTs from *C. gigas* reported in the National Center for Biotechnology Information database of May 2013 or described by Medhioub *et al.* in 2013 [15]. We also look at caspase-3/7 activity, Reactive oxygen species production, and the appearance of apoptotic cells in digestive gland tissue.”

2. Results and Discussion

2.1. Temporal Expression of the Genes Related to Detoxification and Apoptotic Processes

On the five detoxification-related genes tested, Glutathione S-transferase (GST) transcript was over-expressed after exposure of oysters to the two tested *Alexandrium* species. Cytochrome P450 subfamily 1A (CYP1A) transcript was over-expressed when oysters were fed the toxic microalgae *Alexandrium catenella*.

GST transcripts level were significantly ($p < 0.01$) up-regulated 3.2 and 2.6-fold in the digestive gland (DG) of oysters exposed 29 h and 48 h to *A. catenella*, respectively (Figure 1). This same gene GST showed higher transcript levels 2.6 and 3.9-fold in DG of oysters exposed 29 h and 48 h to non-toxic *A. tamarense*, respectively (Figure 1). Glutathione S-transferase belongs to a large super-family of multi-functional enzymes primary involved in cellular detoxification by catalyzing the nucleophilic attack by glutathione (GSH) on electrophilic compounds with a wide range of endogenous and xenobiotic agents, including environmental toxins and oxidative stress products [22–27]. GST transcript abundance was previously demonstrated to be over expressed in oysters exposed to toxic and non toxic cells of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* [17]. Similarly, in our experiment, GST transcript level was up-regulated in oysters exposed to the PSTs producer *A. catenella* but also to non toxic *A. tamarense*. These results suggest that the increase in GST transcript level is not related to PSTs accumulated in the DG but could be related to respiratory burst induced by the biotransformation and disposition of a wide range of endogenous dinoflagellates compounds [28].

Figure 1. Relative expression of 5 detoxification-related gene transcripts and 8 apoptotic-related gene transcripts (normalized to ribosomal protein F40) in the digestive gland of *Crassostrea gigas* exposed for 29 h (A) and 48 h (B) to *Alexandrium tamarense* (grey) or to *Alexandrium catenella* (black) related to the non exposed oysters. The dashed line represents the mean value of the control group (non exposed oysters) for each gene. Bars represent mean $\pm$ standard errors ($N = 10$ animals). * $p < 0.01$.

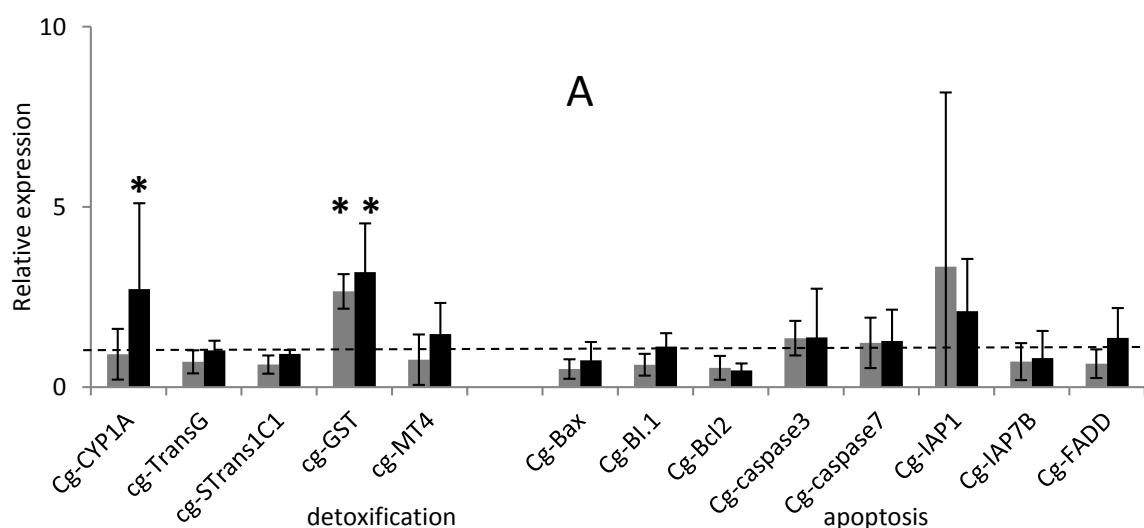
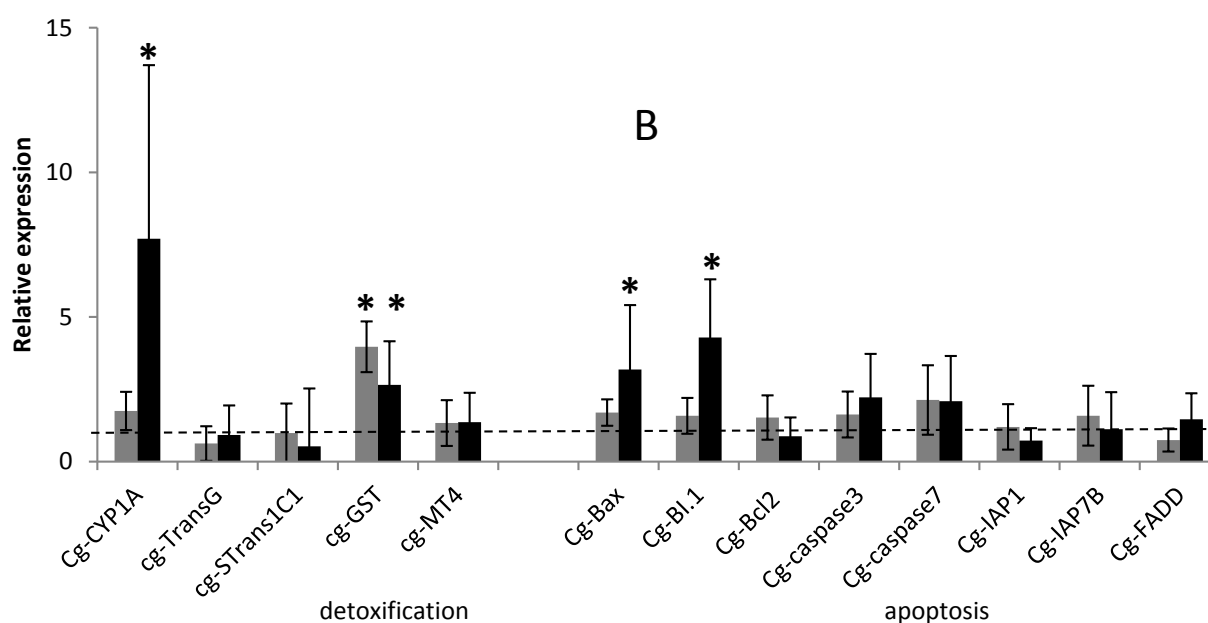


Figure 1. Cont.



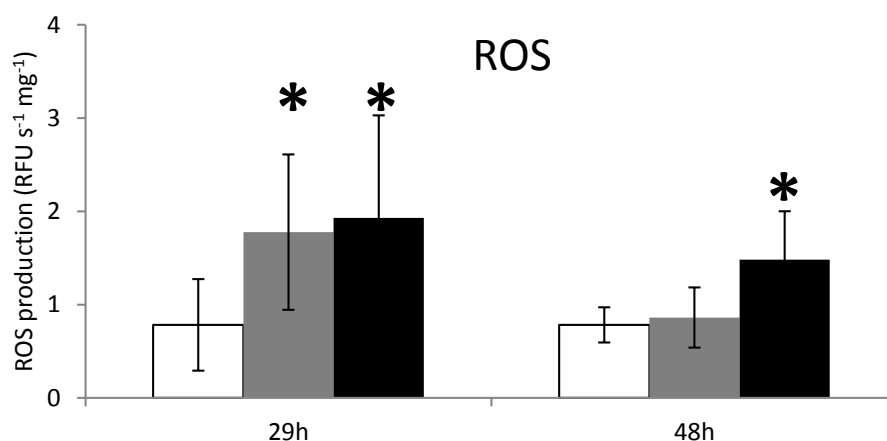
CYP1A transcripts were significantly over-expressed ($p < 0.01$) at 29 h and 48 h (2.7- and 7-fold, respectively) in the DG of oysters exposed to *A. catenella*, in comparison to not fed oysters or those exposed to *A. tamarens* (Figure 1). The cytochrome P450 family is a large and diverse group of enzymes that generally constitute the first enzymatic defense against foreign molecules. In bivalve mollusks, studies investigated variations in CYP1A transcripts in relation to several biotic and abiotic factors [29,30]. CYP1A transcripts have been demonstrated to be up-regulated in gills of oysters exposed to changing water temperature [31] and in DG of oysters exposed to hydrocarbon contamination [32]. Unlike *CYP1A*, *C. gigas* hemocytes exposure to brevetoxin led to a decrease in transcript level of *CYP356A1* a CYP450 isoform [33].

On the eight apoptotic-related genes tested, *Bcl.1* and *Bax* were significantly over-expressed ($p < 0.01$) in the DG of oysters exposed 48 h to *A. catenella*, presenting an increase (4.3- and 3.1-fold, respectively) in comparison to oyster non-exposed (Figure 1B). Interestingly, transcript levels of the other *C. gigas* detoxification and apoptotic-related genes did not show any significant modulation under the different treatments after 29 h and 48 h of exposure (Figure 1). The intrinsic pathway of apoptosis which implies the cytochrome c release from mitochondria appears to be largely mediated by direct or indirect ROS action [34]. B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins, composed of pro- and anti-apoptotic members, regulate this process by releasing apoptotic signals from the mitochondria. In our experiment, on the pro-apoptotic gene tested, *Bax* was significantly over-expressed after 48 h exposure time of oysters to *A. catenella* suggesting that the intrinsic pathway of apoptosis has been activated. In mammals, Bax protein members play a central role in the induction of the mitochondrial apoptosis pathway by promoting the release of apoptotic factors, such as cytochrome c into the cytosol, responsible for further activation of the executioner caspases (cysteine aspartate proteases) family of proteins, which plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis [34–39].

2.2. ROS Production

Results show a significant increase ($p < 0.01$) in the production of reactive oxygen species (ROS) in DG of oysters at 29 h exposure to both non-toxic *A. tamarens* and toxic *A. catenella* (Figure 2). ROS production is not related to PSTs accumulated in DG at least for this exposure time. However, in the same experiment at a 48-h exposure time, ROS production remains high in oysters exposed to the toxic *A. catenella* (Figure 2). Knowing that the two *Alexandrium* species have nearly the same morphology and organic compounds, these results provide the first evidence that the presence of PSTs in the oyster DG induces directly or indirectly a permanent stress response in this organ after two days exposure to the toxic algae. Garcia-Lagunas [17] showed an increase of ROS production in *C. gigas* fed the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. In contrast, ROS production decreased when *C. gigas* hemocytes were exposed to the PSTs producer *Alexandrium minutum* [40], but was not modulated in hemocytes of *Crassostrea virginicas* exposed to the PSTs producer *Alexandrium fundyense* [19]. This suggests that specific PST compounds are related to ROS production.

Figure 2. ROS production measurements in the digestive gland tissues of oysters not exposed (**white**) or exposed 29 h and 48 h to *Alexandrium catenella* (**black**) or to *Alexandrium tamarens* (**grey**). * $p < 0.01$.



Multiple enzyme systems can contribute to the generation of ROS, but it appears that CYP450 family may have an important role in any case [41,42]. In the endoplasmic reticulum, ROS are produced by the microsomal monooxygenase system composed of CYP450 members, NADPH-P450 reductase (NPR) and phospholipids [43]. In mammals, the over-expression of *CYP1A* is associated with the production of ROS, including superoxide anion and hydrogen peroxide (H_2O_2) [44]. Even so, it has been difficult to clearly define the role of P450-generated oxidative stress in this experiment, but the production of ROS at 48 h of exposure could be generated by CYP1A activity.

2.3. Apoptosis in Digestive Gland

When *C. gigas* were exposed 29 h to the microalgae *A. catenella* or *A. tamarens*, no modulation of the caspase-3/7 activity was detected (Figure 3). However, after 48 h of exposure, caspase-3/7 activity

decreased significantly in oysters exposed to *A. catenella*, but not in unfed oysters or oysters exposed to *A. tamarense* (Figure 3).

Figure 3. Caspases 3/7 activity measurements in the digestive gland tissues of oysters not exposed (**white**) or exposed 29 h and 48 h to *Alexandrium catenella* (**black**) or to *Alexandrium tamarense* (**grey**). * $p < 0.01$.

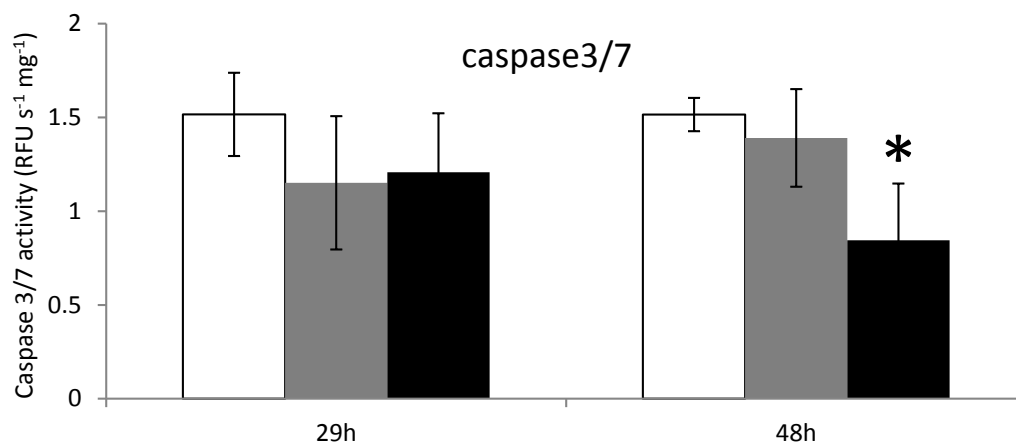
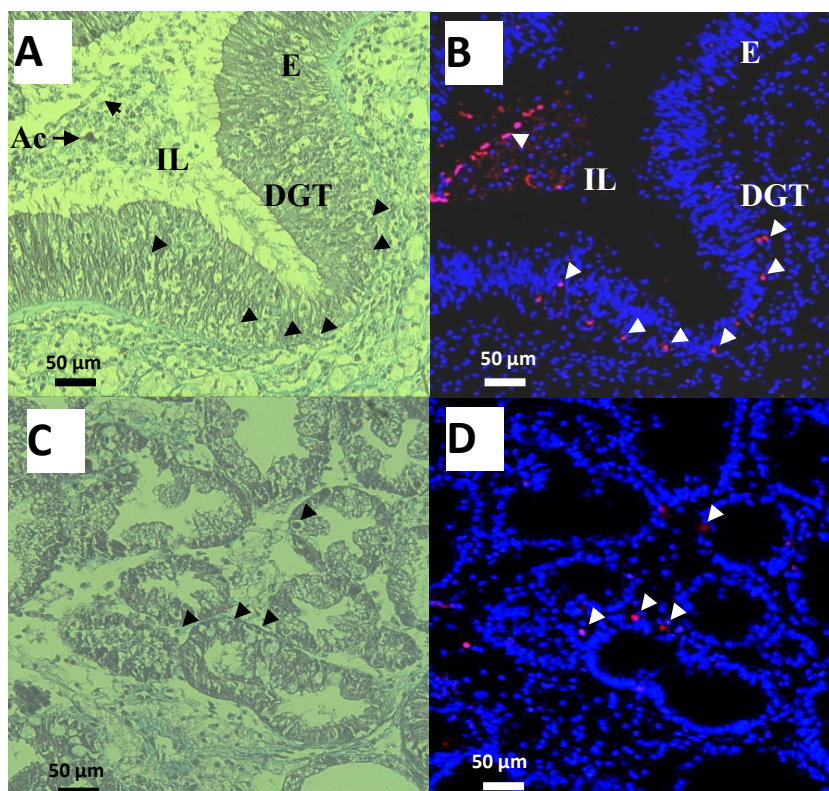


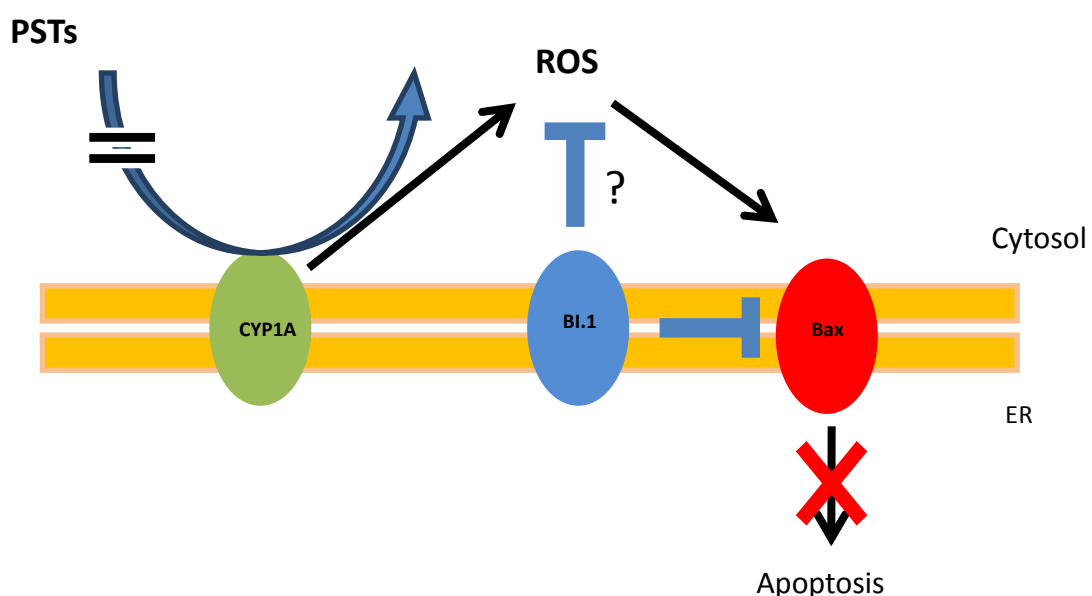
Figure 4. Observations of cells in the digestive gland tubules (DGT), intestine epithelium (E) and Lumen (IL) of oysters exposed for 48 h to *Alexandrium catenella* (Ac). (A,C) Trichrome de Masson staining (B,D) Terminal deoxynucleotidyl Transferase Tetra Methyl Rhodamine Nick End Labeling (TMRNEL) staining (nuclei are stained in blue, nuclei of apoptotic cells in red (Δ)).



In addition, intact *A. catenella* cells were observed in intestine lumen (IL) of oysters exposed for 48 h to this microalga (Figure 4A). Thickness of digestive gland tubules (DGT) showed a dominant star-shape in the intestine lumen formed by digestive cells, indicating that the oysters were actively feeding and absorbing (Figure 4C). Moreover, no microalgae cells were observed in digestive tubules (Figure 4C). Epifluorescent observations of the corresponding sections showed few apoptotic cells through epithelia of the intestine (Figure 4B), intestine lumen (Figure 4B), and digestive tubules (Figure 4D). Similar results were observed in the DG of unfed oysters or oysters exposed to the non-toxic *A. tamarensis* (data not shown).

In similar experiment, we previously demonstrated that exposure of oysters to toxic *A. catenella* induces apoptosis of circulating hemocytes even though Bax and executioner caspases were over-expressed before apoptosis occurred [20]. Interestingly, here we found no modulation of the mRNA expression levels of caspase-3/7 (Figure 1). Moreover caspase-3/7 activities decreased (Figure 3) and no significant apoptotic cells in tubules and in intestine were observed (Figure 4). A feedback mechanism for regulation of cells death process may occur. On the four anti-apoptotic molecules *Bcl2*, *BI.1*, *IAP1*, *IAP7B* tested, *BI.1* was significantly up-regulated at 48 h exposure. In mammals, several lines of evidence suggest that *BI.1* modulates the intrinsic apoptotic pathways [45–47] and inhibits ROS accumulation [48,49]. Similarly in the oyster, *BI.1* could play a key role for the control of ROS production and apoptosis by regulating Bax-induced cell death throughout the suggested mechanism presented in Figure 5. Apoptosis has been recognized to be an essential defense mechanism in oysters against invasion of pathogens [50]. Further studies should investigate whether the control of apoptosis in the DG related to PST contamination may promote the microbial pathogens (e.g., *Vibrio* sp.) invasion and, thereby, increase the susceptibility of oysters to disease.

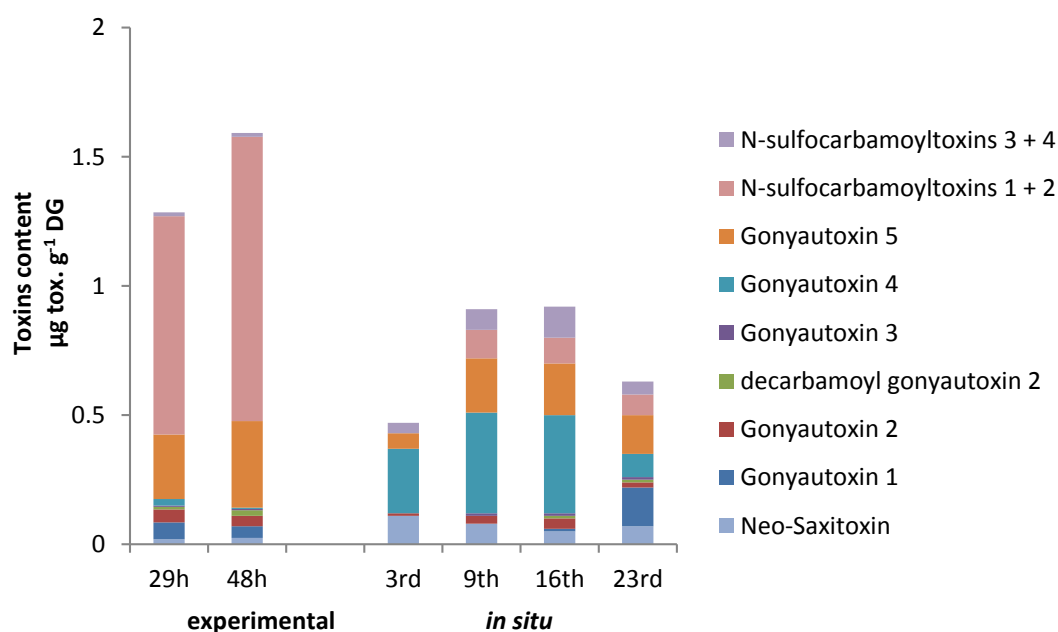
Figure 5. BI.1 regulates apoptosis induce by PST accumulation. In oyster stress cells, CYP1A can directly or indirectly neutralize and convert PST to ROS. ROS induces the expression of the protein Bax, which promote the intrinsic apoptotic pathway. BI-1 can inhibit Bax and could limit CYP1A production of ROS preventing the apoptosis.



2.4. PSTs Accumulation and Correlations with Natural Exposure to *Alexandrium catenella*

The toxin content of *Alexandrium catenella* (ACT03 strain) was 5.3 ± 0.4 pg toxins/cell. The following toxins were found in decreasing proportion: *N*-sulfocarbamoyltoxins 1 + 2 (50.9%), Gonyautoxins 5 (35%), Gonyautoxins 4 (12%), Gonyautoxins 1 (1%) and neo-Saxitoxin (1%) with *N*-sulfocarbamoyltoxins 3 + 4, Gonyautoxins 3, Saxitoxin and decarbamoyl-Saxitoxin present as trace amounts (not shown). No PSTs were detected in *Alexandrium tamarense* (ATT07) strain. During the 48-h experiment, PSTs accumulated in the digestive gland of oysters fed *A. catenella* (Figure 6).

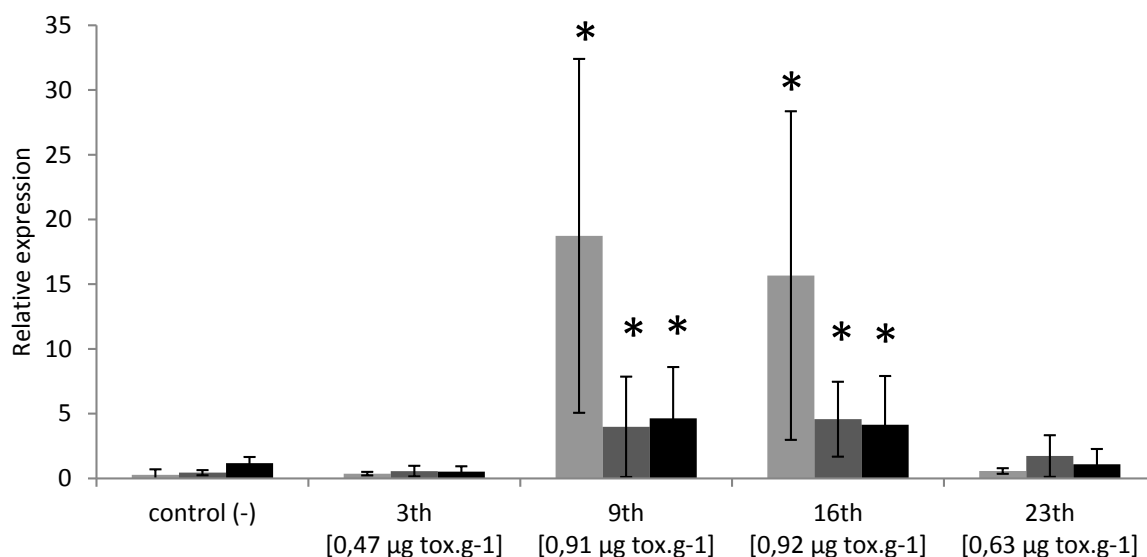
Figure 6. Evolution of the paralytic shellfish toxin (PST) content ($\mu\text{g/g}$ DG wet weight) in the digestive gland of *Crassostrea gigas* individuals experimentally exposed to *Alexandrium catenella* (**left**) and to the natural toxic event occurring in may 2011 in Thau lagoon (**right**). The bar charts represent (in %) the temporal toxin.



The toxicity level reached 1.26 (0.17) and 1.56 (0.18) $\mu\text{g/g}$ DG wet weight (μg Saxitoxin diHCl equivalent/g DG wet weight) at 29 and 48 h, respectively. The following toxins at 48 h were found in decreasing proportion: *N*-sulfocarbamoyltoxins 1 + 2 (69.1%), Gonyautoxin 5 (21%), Gonyautoxin 1 (2.8%), Gonyautoxin 2 (2.5%), decarbamoyl-Gonyautoxin 2 (1.4%), neo-Saxitoxin (1.6%) and *N*-sulfocarbamoyltoxins 3 + 4 (0.9%), with Gonyautoxins 3 and 4 present as trace amounts. This profile differs from *A. catenella* (ACT03) by an increase of the proportion of *N*-sulfocarbamoyltoxins 1 + 2 and a decrease in the proportion of Gonyautoxins 4 and 5 indicating that biotransformation occurred [51]. The rate of accumulation of PST in the tissues of marine bivalves is influenced not only by their feeding behavior (toxins intake rate), but also by the different chemical processes that take place in the bivalve tissues. Changes between the PST profile of *A. catenella* and the profile observed in DG of oysters may arise from epimerization of the accumulated toxins, chemical or enzymatic transformations and/or selective retention of the individual toxins [52–54].

PSTs accumulation in oysters exposed to toxic event in Thau lagoon reached 0.47 (0.26), 0.91 (0.34), 0.92 (0.33) and 0.63 (0.28) $\mu\text{g/g}$ DG wet weight (μg Saxitoxin diHCl equivalent/g DG wet weight) on 3, 9, 16 and 23 May, 2011, respectively (Figure 6). PST profiles were characterized by the dominance of the Gonyautoxins 4 (14% to 53%) and low concentration of *N*-sulfocarbamoyltoxins 1 + 2 (0% to 12%). Similarly to experimental exposure *BL1*, *Bax* and *CYP1A* transcripts levels were significantly over-expressed in DG of wild oysters collected on 9 and 16 May 2011, corresponding to toxin concentration 0.91 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 0.92 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectively (Figure 7). However, no modulation was detected in oysters collected on 3 and 23 May 2011, which corresponds to PSTs concentration of 0.47 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 0.63 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively (Figure 7).

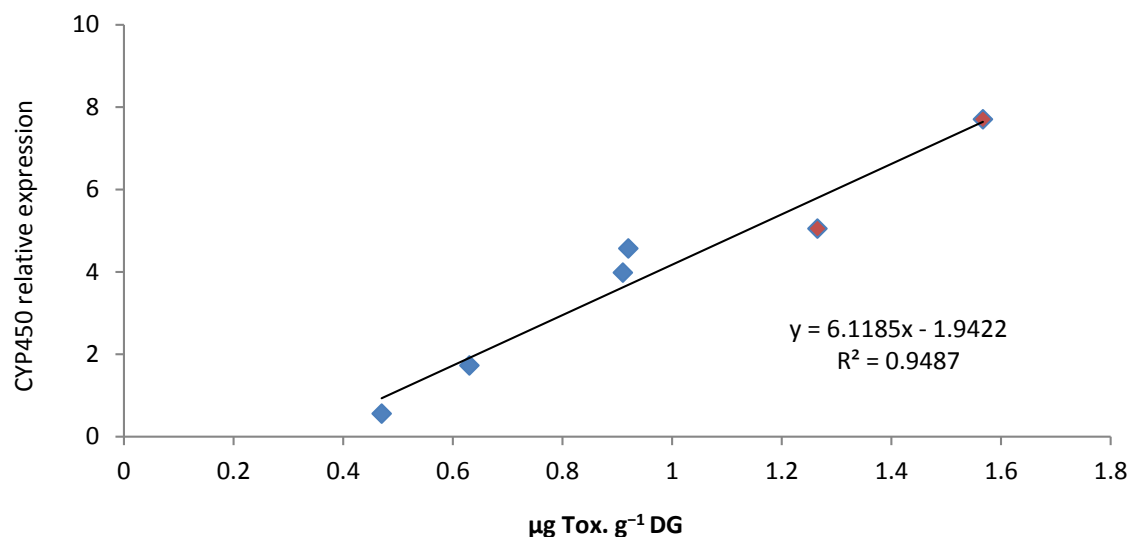
Figure 7. Relative expression of *cg-CYP1A* (grey), *cg-BL1* (dark-grey) and *cg-Bax* (black) transcripts (normalized to ribosomal protein F40) in the digestive gland of *Crassostrea gigas* exposed to a PST event occurring in May 2011 in Thau lagoon. Bars represent mean $\pm$ standard errors ($N = 5$ animals). * $p < 0.01$.



CYP1A have been described as a microsomal monooxygenase catalyzing the first step in biotransformation of many organic xenobiotics such as Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH), Polychlorinated Biphenyl (PCB), dioxins, acrylamines, nitroaromatics [55]. Moreover, *CYP1A* regulation appears to be conserved in divergent groups of vertebrates and the elevation of CYP1A protein levels was demonstrated to be preceded by an increase in *CYP1A* mRNA levels following PAH exposure [56]. Our results show that *CYP1A* was up-regulated in DG of oysters exposed to *A. catenella*. Moreover, modulation of mRNA expression was demonstrated to depend directly on PSTs concentration (Figure 8).

Such positive correlations have been found in feral fish between organic xenobiotics concentration and *CYP1A* expression level [57]. Although PSTs biotransformation associated to CYP1A activity has not been described yet, it could explain the difference between PST profile of *A. catenella* and that observed in DG of oyster exposed to *A. catenella*.

Figure 8. Correlation between the expression of *cg-CYP1A* transcripts (normalized to ribosomal protein F40) and PST concentration in digestive gland of *Crassostrea gigas* experimentally exposed (red) and *in situ* exposed (blue).



Presently the mouse bioassay (MBA) still forms the basis of most shellfish toxicity monitoring programs. The procedure was developed more than half a century ago and has been refined and standardized by the Association of Official Analytical Chemists [58]. However, MBA holds a number of recognized disadvantages such as low sensitivity with a detection limit of 40 µg STX/100 g of shellfish tissue with a precision of ± 15 –20 percent. This test suffers from high variability, non-specific response, and the procedure raises ethical issues due to the use of laboratory animals. There are growing concerns about the continued use of mammals for bioassay. Alternative methods are developed such as chemical analyses using high performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection (HPLC–FLD) and liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) which are more specific and sensitive (detection limit of 3 µg/g STXeq 100 g⁻¹) [59]. However, these methods require a high maintenance cost and skilled operators. Alternatively, immunoassay and open-sandwich immunoassay (OS-IA) methods are more sensitive than MBA and less expensive, but detect only specific PSTs of the 24 Saxitoxin (STX)-like identified [60,61]. When considered individually, the expression of genes related to detoxification (CYP1A) and apoptosis (Bax and BI-1) was not specific to the presence of PSTs in *C. gigas*. However, when these genes are considered together and knowing their potential role in the control of stress in oysters, their expression level could be a valuable biomarker to detect the stress induced by accumulated PSTs. Nevertheless, the use of CYP1A, BI.1 and Bax genes expression as accurate biomarkers requires further investigation because chemical and biological pollutants present in certain anthropized marine ecosystems could potentially modulate the expression of these genes.

3. Experimental Section

3.1. In Situ Contamination

Wild adult Pacific oysters *Crassostrea gigas* individuals (≥ 60 mm, shell length) were collected from natural beds in Thau lagoon (N 43°26.058' and E 003°39.878', Bouzigues, Languedoc-Roussillon, France) in May 2011 when PSTs contamination of oysters was observed. Digestive gland tissues from 5 oysters were randomly taken at each sampling date, during 3rd, 9th, 16th and 23rd days of the month to perform genes expression and toxin analyses.

3.2. Experimental Exposure to the Neurotoxic *Alexandrium catenella*

3.2.1. Oysters and Microalgae

Adult Pacific oyster *C. gigas* were collected in November 2011 from an oyster farm in the Thau lagoon (Masson SARL, Languedoc-Roussillon, France) during periods when toxic events did not occur. The average total oyster fresh weight was 13.0 ± 2.9 g (average $\pm$ SD), average digestive gland weight was 1.8 ± 0.5 g and average shell length was 11.0 ± 1.0 cm. Before the experiments, oysters were exposed to a continuous flow of filtered (10 μ m) Mediterranean seawater maintained in partial starvation, having only bacteria and nanoplankton to feed, at a constant temperature of 20 ± 1 °C during two weeks for acclimatization.

The experiments were carried out with a toxic *A. catenella* (ACT03 strain) and a non-producer of PSTs, *A. tamarense* (ATT07 strain), isolated from the Thau lagoon in 2003 and 2007, respectively. The enriched natural sea water [62] culture medium was used to cultivate these two species and was characterized by a salinity of 35 PSU. The two dinoflagellates were grown in batch cultures at 20 ± 1 °C, under a cool-white fluorescent illumination (100 μ M photons/m²/s) and a 12 h:12 h light:dark cycle. For the feeding experiments, we used algae in their exponential growth phase.

3.2.2. Experiments

Two independent experimental exposures were carried out. For each experiment, after two weeks of acclimatization, 180 oysters were randomly placed into six tanks (30 individuals per tank) containing 10 L of filtered (0.2 μ m) seawater. The experiments were conducted at a constant temperature of 20 ± 1 °C. Cells of *A. catenella* (two tanks) or *A. tamarense* (two tanks) were added into tank water regularly to maintain cell concentration ($\geq 1 \times 10^6$ cells/L) equivalent to that observed during a natural bloom in Thau lagoon [2]. In two control tanks, oysters were incubated in filtered (0.2 μ m) sea water without microalgae. The mean concentrations in the tank water of the experiments for toxic *A. catenella* and non-toxic *A. tamarense* were $(1.35 \pm 0.02) \times 10^6$ cells/L and $(2.20 \pm 0.23) \times 10^6$ cells/L, respectively. Fresh cells were regularly added at 3, 6, 21 and 29 h to approach the initial cell concentrations. However, during the 48-h experiment, concentrations in tank water ranged between 1×10^6 cells/L and 2.5×10^6 cells/L. To estimate the concentration of cells in tanks during the experiment, triplicates of 1 mL of water were collected, and cells were fixed with Formalin (2%), and then counted in a Nageotte counting chamber using a photonic microscope (Cardinal Health, Dublin, Ireland).

3.2.3. Tissue Sampling

Digestive gland tissues from 5 oysters randomly removed from tanks (containing 30 individuals each) were collected at time 0 (control), 29 and 48 h for gene expression analysis, apoptotic cells detection, caspase-3/7 activity and ROS production measurements. The remaining digestive gland were pooled and stored at -20°C until the toxin extraction was performed. Hemocytes from oysters were also randomly taken from tanks at time 0 (control), 3, 6, 21, 29 and 48 h.

3.3. Genes Expression Analysis

The expression level of putative detoxification and putative apoptotic-related genes was measured in *C. gigas* exposed to toxic *A. catenella* or to the non-toxic *A. tamarensis* at 29 and 48 h after the beginning of the experiment. In order to quantify the relative transcript levels of the selected detoxification-related genes (*CYP1A*, *TransG*, *STrans1C1*, *GST* and *MT4*) and the apoptotic-related genes (*Bax*, *BI-1*, *Bcl2*, *caspase-3* and *caspase-7*, *IAP1* and *IAP-7B* and *FADD*), digestive gland tissues were collected and placed in 0.5 mL of Trizol buffer and conserved at -20°C . Total RNA was isolated from the oyster digestive gland using the standard Trizol method (Invitrogen Life Technologies SAS, Saint Aubin, France), then treated with DNase (Invitrogen) to eliminate the contamination of genomic DNA. After sodium acetate precipitation, the quantity and quality of total RNA was determined using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and agarose gel electrophoresis, respectively. Following heat denaturing (70°C for 5 min), reverse transcription was performed using 1 μg of DG RNA prepared with 50 ng/ μL oligo-(dT) 12 mer–18 mer in a 20- μL reaction volume containing 1 mM dNTPs, 1 unit/ μL of RNaseOUT and 200 units/ μL Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) in reverse transcriptase buffer, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Life Technologies SAS, Saint Aubin, France).

The primer pairs used to quantify the expression level of apoptotic-related genes were designed according to the sequence available in GenBank. The expression of the ribosomal protein, F40, was used as the housekeeping gene control. All sequences of primers used for the amplification of apoptotic-related genes were published by Medhioub [20]. Sequences of primers used for the amplification of putative detoxification related genes are shown in Table 1.

Table 1. Primers sequences for amplification, and size of the obtained products.

Gene	Primers Sequences 5'→3'	Product Size (bp)	GenBank ID
<i>Cg-CYP1A</i>	GACCGGAATCCAAGACTC GCAGTGTTTCCATGACGAC	70	CB 617404
<i>Cg-TransG</i>	AATCTACATCAAGAGTGACG AGGCTGCATTTTCGTAAGAGG	144	EE 677859
<i>Cg-STrans1C1</i>	GGATGTCGAGTGTTTCAGATG TTCTGTAGTGCTGGACTTTAG	119	CB 617550
<i>Cg-GSTO</i>	CTGTCCGTATGCTCAACGAG CTGCTGTGACTATTTGGACC	188	CB 617512
<i>Cg-MT4</i>	CAGCTCACACAGTCCCTTC CATGTACAGTTACACGATGC	143	AM 265551

Real-time PCR amplifications were performed in the Light Cycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). In short, the following components were mixed to the indicated end-concentration: 5 mM MgCl₂, 0.5 µM of each primer, 2.5 µL of reaction mix (Light Cycler® 480 SYBR® Green I Master mix, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in a final volume of 5 µL. Reverse transcribed RNA (1 µL) diluted 1/10 was added as the PCR template to the Light-Cycler master mix, and the following run protocol was used: initial denaturing at 95 °C for 5 min; 95 °C for 10 s; 10 s at 58 °C; 72 °C for 10 s with a single fluorescence measurement; a melting curve program (65–97 °C) with a heating rate of 0.11 °C/s; a continuous fluorescence measurement; and a cooling step to 40 °C. Each PCR was performed in triplicate. To determine the qPCR efficiency of each primer pair used, standard curves were generated using six serial dilutions (1:1, 1:3, 1:7, 1:15, 1:31, 1:63) of a unique cDNA sample constituted from a pool of all cDNAs obtained from each condition; qPCR efficiencies of the tested genes varied between 1.85 and 1.99. Moreover, the real-time PCR product analysis on agarose gel and by melting curve revealed a unique lane and a unique peak, respectively, indicating the formation of a single PCR product with no artefacts (data not shown). For further expression level analysis, the Crossing Points (CP) were determined for each transcript using the Light Cycler software (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The amount of apoptotic-related genes expressed was calculated relative to the amount of the ribosomal protein F40 housekeeping gene (because of its lower coefficient of variation) using the delta-delta threshold cycle ($\Delta\Delta Ct$) method [63].

3.4. Apoptotic Cells Detection Assay

A 5-mm cross-section including the digestive gland was taken from 10 oysters exposed for 48 h to the toxic dinoflagellates *A. catenella*. The dissected tissues were fixed in Davidson's fixative [64] for 48 h. Cross sections were dehydrated in ascending ethanol solution (70°, 95° and 100°), cleared with LMR then embedded in paraffin. Then, 5 µm thick sections were cut, mounted on glass slides, paraffin was removed with LMR and tissues rehydrated in decreasing ethanol solution (70°, 50° and 25°) then wash with phosphate buffer saline (PBS).

For each individual, two serial thick sections were performed from the DG cross section. One section was stained with Trichrome de Masson [65]. The DNA fragmentation that occurs at the early stages of apoptosis was detected by the red fluorescent label of DNA fragmentation (*In Situ* Cell Death Detection Kit, TetraMethylRhodamine (TMR) red, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) on the second section according to the manufacturer's recommendations. Briefly, tissues were permeabilized for 8 min in PBS buffer containing 0.1% Triton X-100 and 0.1% sodium citrate. TMR red was added; then cells were incubated in the dark for 60 min at 37 °C. After three washes with PBS buffer, slides were cover with, 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) and incubated in the dark for 10 min. Upon staining, the fluorescent products generated by the two dyes can be visualized using a wide-field fluorescence microscope Olympus AX70 (Olympus corporation, Tokyo, Japan) equipped with standard red (540 nm–580 nm, TMRred) and blue (358 nm–461 nm, DAPI) filter sets.

3.5. Caspase-3/7 and ROS Activities Assays

An amount of 100 mg of digestive gland from 10 oysters (two tanks) non-exposed or exposed for 29 h and 48 h to the PST producer *A. catenella*, or the non toxic *A. tamarensis* were crushed and

homogenized in 0.5 mL of PBS buffer (Digestive gland suspension solution). The caspase-3/7 activity was performed by the *AFC SensoLyte Homogeneous AFC caspases-3/7 assay kit* (Anaspec). Briefly, 50 μ L of the DG solution was mixed with 50 μ L of caspases solution (50 μ L caspases-3/7 substrate Ac-DEVD-AFC, 200 μ L of DTT and 4.75 mL of assay buffer) then drop in black flat bottom 96-well plate. Upon caspases-3/7 cleavage, Ac-DEVD-AFC generates the AFC fluorophore which has bright blue fluorescence and can be detected at excitation/emission = 300 nm/500 nm. Fluorescence intensity of the samples is determined using the spectrometer TECAN® (Tecan Group Ltd, Männedorf, Swiss). The kinetics of caspase-3/7 activity was determined in a continuous manner by recording the data every 5 min for 60 min. The ROS activity was performed by *Total ROS/superoxide detection Kit* (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France). Briefly, 50 μ L of the DG suspension was mixed with 50 μ L of 1 mM solution of 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) then drop in black flat bottom 96-well plate. This molecule will penetrate through the cell membrane and the presence of intracellular ROS will cleave to release the fluorophore molecule DCF that can be detected by measuring the fluorescence at excitation/emission = 480 nm/530 nm. To assess specific activity of caspase-3/7 and ROS production, total proteins contents was determined by the BCA Protein assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer protocol. Samples were compared to a standard curve of bovine serum albumin (BSA). Results are expressed for ROS production and for caspases activities in relative fluorescence unit (RFU) per second per mg of protein.

3.6. Chemical Analysis of PSPs by Liquid Chromatography/Fluorescence Detection (LC/FD)

The pooled digestive gland tissues were frozen at -20°C until further processing. To extract the toxins, 5 mL of 0.1 N hydrochloric acid were added and the samples were mixed for 2 min with a high-speed homogenizer (15,000 rpm). The pH of the mixture was adjusted between 2.0 and 4.0 and the samples were centrifuged at 4200 g for 10 min at 4°C [66]. The supernatants were filtered on 10 KDa PES filters and analyzed using the LC/FD PSP toxin analyses method of Van De Riet [59]. The toxins as GTXs, dc-GTXs, dc-STXs and STXs were separated by reverse chromatography using a RP column (Zorbax Bonus RP, 3.5 μ M, 4.6×150 mm, Agilent Technologies, Massy, France) with a flow rate of 0.8 mL/min. The eluent pH and/or column temperature were optimize for the separation of some toxins (dc-GTX3/GTX5/dc-GTX-2 & C1/C2). The toxins were quantified using certified standards provided by CNRC (Halifax, Canada). An acid hydrolysis (HCl 0.4 N at 97°C for 5min) was used to confirm the presence of GTX6 [67]. The C-toxins were separated by a Thermo Beta Basic 8 column (5 μ m, 4.6×250 mm) with a flow rate of 0.8 mL/min. Triplicates of 10 mL batch cultures (cell concentration $\geq 10^7$ cells/L) were sampled during the exponential growth phase of the cultivated dinoflagellates. After centrifugation (3000 g, 15 min, 4°C), the cells were suspended in 1 mL of 0.1 N acetic acid and frozen at -20°C . To release the toxins, the samples were sonicated for 60 min, and then centrifuged at 17,000 g for 10 min at 4°C . The toxins analyses of filtered supernatants were performed as explained above.

3.7. Statistics

Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey test (Statistica 10.0 software, StatSoft, Maison-Alfort, France). Values are mean $\pm$ SD of 10 individuals from two independent experiments and 5 individuals from *in situ* sampling. * $p < 0.01$.

4. Conclusions

This study is the first examine the relationships between PSTs accumulation and metabolic process that occur in the digestive gland of oysters exposed to toxic dinoflagellates. Results show that a feedback mechanism to control apoptosis and detoxification process occurs in the digestive gland of *Crassostrea gigas* experimentally exposed to the PSTs producer *Alexandrium catenella*. Moreover when considered together the expression level of genes implicated in those processes could be used as biomarker to assess stress caused by PSTs accumulation.

Acknowledgments

We thank Marc Leroy for technical assistance. We thank also Tim Green for his help in the writing of this paper. This work was supported by the IFREMER and the APOTOX project funded by the French National program EC2CO (INSU CNRS, Ecosphère Continentale et Côtière) and by AVERROES program for post-doc financial support.

Author Contributions

W.M, M.L and J.L.R Conceived and designed the experiments; W.M, E.M, E.A, M.L and J.L.R Performed the experiments; A.V, C.A, V.S, and Z.A contributed new reagents/analytic tools; W.M, M.L and J.L.R analysis Data; and J.L.R wrote the paper.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Clark, R.F.; Williams, S.R.; Nordt, S.P.; Manoguerra, A.S. A review of selected seafood poisonings. *Undersea Hyperb. Med.* **1999**, *26*, 175–184.
2. Laabir, M.; Jauzein, C.; Genovesi, B.; Masseret, E.; Grzebyk, D.; Cecchi, P.; Vaquer, A.; Perrin, Y.; Colos, Y. Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *J. Plankton Res.* **2011**, *33*, 1550–1563.
3. Landsberg, J.H. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev. Fish. Sci.* **2002**, *10*, 113–390.
4. Catterall, W.A. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1980**, *20*, 15–43.

5. Zingone, A.; Enevoldsen, H.O. The diversity of harmful algal blooms: A challenge for science and management. *Ocean Coast. Manag.* **2000**, *43*, 725–748.
6. Shumway, S.E. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *J. World Aquacul. Soc.* **1990**, *21*, 65–104.
7. Bricelj, V.M.; Shumway, S.E. Paralytic shellfish toxins in bivalve mollusks: Occurrence, transfer kinetics and biotransformation. *Rev. Fish Sci.* **1998**, *6*, 315–383.
8. Gainey, L.F.; Shumway, S.E. A compendium of the responses of bivalve mollusks to toxic dinoflagellates. *J. Shellfish Res.* **1988**, *7*, 623–628.
9. Alexander, J.A.; Stoecker, D.K.; Meritt, D.W.; Alexander, S.T.; Johns, D.; van Heukelem, L.; Glibert, P. Differential production of feces and pseudo-feces by the oyster *Crassostrea ariakensis* when exposed to diets containing harmful dinoflagellate and raphidophyte species. *J. Shellfish Res.* **2008**, *27*, 567–579.
10. Li, S.C.; Wang, W.X.; Hsieh, D.P.F. Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. *Mar. Environ. Res.* **2002**, *53*, 145–160.
11. Haberkorn, H.; Lambert, C.; Le Goic, N.; Moal, J.; Suquet, M.; Gueguen, M.; Sunila, I.; Soudant, P. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* **2010**, *9*, 427–439.
12. Bardouil, M.; Bohec, M.; Cormerais, M.; Bougrier, S.; Lassus, P. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.* **1993**, *12*, 417–422.
13. Wildish, D.; Lassus, P.; Martin, J.; Saulnier, A.; Bardouil, M. Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium* sp. on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* **1998**, *11*, 35–43.
14. Lassus, P.; Baron, R.; Garen, P.; Truquet, P.; Masselin, P.; Bardouil, M.; Leguay, D.; Amzil, Z. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penze estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* **2004**, *17*, 207–214.
15. Medhioub, W.; Lassus, P.; Truquet, P.; Bardouil, M.; Amzil, Z.; Séchet, V.; Sibat, M.; Soudant, P. Spirolide uptake and detoxification by *Crassostrea gigas* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Aquaculture* **2012**, *358–359*, 108–115.
16. Rolland, J.L.; Pelletier, K.; Masseret, E.; Rieuvilleneuve, F.; Savar, V.; Santini, A.; Amzil, Z.; Laabir, M. paralytic toxins accumulation and tissue Expression of α -amylase and lipase genes in the pacific oyster *Crassostrea gigas* fed with the neurotoxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 2519–2534.
17. Garcia-Lagunas, N.; Romero-Geraldo, R.; Hernandez-Saavedra, N.Y. Genomics Study of the Exposure Effect of *Gymnodinium catenatum*, a Paralyzing Toxin Producer, on *Crassostrea gigas* Defense System and Detoxification Genes. *PLoS One* **2013**, *8*, e72323.
18. Hégaret, H.; Wikfors, G.H.; Soudant, P.; Lambert, C.; Shumway, S.E.; Berard, J.B.; Lassus, P. Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effect on oyster hemocytes. *Mar. Biol.* **2007**, *152*, 441–447.
19. Hégaret, H.; da Silva, P.M.; Wikfors, G.H.; Haberkorn, H.; Shumway, S.E.; Soudant, P. *In vitro* interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve mollusks. *Cell Biol. Toxicol.* **2011**, *27*, 249–266.

20. Medhioub, W.; Ramondenc, S.; Vanhove, A.; Vergnes, A.; Masseret, E.; Savar, V.; Amzil, Z.; Laabir, M.; Rolland, J.L. Exposure to the Neurotoxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella* induces apoptosis of the oyster *Crassostrea gigas* hemocytes. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 4799–4814.
21. Gueguen, M.; Bardouil, M.; Baron, R.; Lassus, P.; Truquet, P.; Massardier, J.; Amzil, Z. Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquat. Living Resour.* **2008**, *1*, 13–20.
22. Vrolijk, N.H.; Targett, N.M. Biotransformation enzymes in *Cyphoma gibbosum* (Gastropoda: Ovulidae): Implications for detoxification of gorgonian allelochemicals. *Mar. Environ. Res.* **1992**, *88*, 237–246.
23. Agianian, B.; Tucker, P.A.; Schouten, A.; Leonard, K.; Bullard, B.; Gros, P. Structure of a Drosophila sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *J. Biol. Chem.* **2003**, *326*, 151–165.
24. Manduzio, H.; Rocher, B.; Durand, F.; Galap, C.; Leboulenger, F. The point about oxidative stress in mollusks. *Invertebr. Surviv. J.* **2005**, *2*, 91–104.
25. Lesser, P.M. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu. Rev. Physiol.* **2006**, *68*, 253–278.
26. Estrada, N.; Campa-Córdova, A.; Luna, A.; Ascencio, F. Effects of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comp. Biochem. Phys. C* **2007**, *146*, 502–510.
27. Whalen, E.K.; Morin, D.; Lin, Y.C.; Tjeerdema, S.R.; Goldstone, V.J. Proteomic identification, cDNA cloning and enzymatic activity of glutathione S-transferases from the generalist marine gastropod, *Cyphoma gibbosum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *478*, 7–17.
28. Hayes, J.D.; Pulford, D.J. The glutathione S-Transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *30*, 445–600.
29. Stegeman, J.J. Benzo[a]pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusc species from the Western North Atlantic. *Mar. Biol.* **1985**, *89*, 21–30.
30. Livingstone, D.R. Cytochrome P450 and oxidative metabolism in invertebrates. *Biochem. Soc. Trans.* **1990**, *18*, 15–19.
31. Jo, P.G.; Min, T.S.; An, K.W.; Choi, C.Y. Molecular Cloning and mRNA Expression of Cytochrome P450 (CYP450)-related Protein in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*: A Water Temperature and Time Study. *Anim. Cells Syst.* **2009**, *13*, 447–452.
32. Boutet, I.; Tanguy, A.; Moraga, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* **2004**, *329*, 147–157.
33. Mello, D.F.; de Oliveira, E.S.; Vieira, R.C.; Simoes, E.; Trevisan, R.; Dafre, A.L.; Barracco, M.A. Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed *in vitro* to brevetoxin (PbTx-2). *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 583–597.
34. Simon, H.U.; Haj-Yehia, A.; Levi-Schaffer, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* **2000**, *5*, 415–418.

35. Enari, M.; Talanian, R.V.; Wong, W.W.; Nagata, S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* **1996**, *380*, 723–726.
36. Hsu, Y.T.; Wolter, K.G.; Youle, R.J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X-L during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 3668–3672.
37. Slee, E.A.; Harte, M.T.; Kluck, R.M.; Wolf, B.B.; Casiano, C.A.; Newmeyer, D.D.; Wang, H.G.; Reed, J.C.; Nicholson, D.W.; Alnemri, E.S.; *et al.* Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell. Biol.* **1999**, *144*, 281–292.
38. Antonsson, B.; Montessuit, S.; Sanchez, B.; Martinou, J.C. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11615–11623.
39. Salvesen, G.S.; Abrams, J.M. Caspase activation—stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene* **2004**, *23*, 2774–2784.
40. Mello, D.F.; da Silva, P.M.; Barracco, M.A.; Soudant, P.; Hegaret, H. Effects of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* and its toxin (saxitoxin) on the functional activity and gene expression of *Crassostrea gigas* hemocytes. *Harmful Algae* **2013**, *26*, 45–51.
41. Puntarulo, S.; Cederbaum, A.I. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *24*, 1324–1330.
42. Shertzer, H.G.; Clay, C.D.; Genter, M.B.; Schneider, S.N.; Nebert, D.W.; Dalton, T.P. CYP1A2 protects against reactive oxygen production in mouse liver microsomes. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *36*, 605–617.
43. Kopf, P.G.; Walker, M.K. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin Increases Reactive Oxygen Species Production in Human Endothelial Cells Via Induction of Cytochrome P4501A1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *245*, 91–99.
44. Zangar, R.C.; Davydov, D.R.; Verma, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, *199*, 316–331.
45. Xu, Q.; Reed, J.C. Bax Inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol. Cell* **1988**, *1*, 337–346.
46. Lindsay, J.; Esposti, M.D.; Gilmore, A.P. Bcl-2 proteins and mitochondria-Specificity in membrane targeting for death. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813*, 532–539.
47. Robinson, K.S.; Clements, A.; Williams, A.C.; Berger, C.N.; Frankel, G. Bax Inhibitor 1 in apoptosis and disease. *Oncogene* **2011**, *30*, 2391–2400.
48. Kim, E.J.; Park, H.; Park, J.G.; Jun, J.G.; Park, J.H.Y. The Grape Component Piceatannol Induces Apoptosis in DU145 Human Prostate Cancer Cells via the Activation of Extrinsic and Intrinsic Pathways. *J. Med. Food* **2009**, *12*, 943–951.
49. Lee, G.H.; Kim, H.K.; Chae, S.W.; Kim, D.S.; Ha, K.C.; Cuddy, M.; Kress, C.; Reed John, C.; Kim, H.R.; Chae, H.J. Bax inhibitor-1 regulates endoplasmic reticulum stress-associated reactive oxygen species and heme oxygenase-1 expression. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21618–21628.
50. Canesi, L.; Gallo, G.; Gavioli, M.; Pruzzo, C. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Tech.* **2002**, *57*, 469–476.

51. Turner, A.D.; Lewis, A.M.; Hatfield, R.G.; Galloway, A.W.; Higman, W.A. Transformation of paralytic shellfish poisoning toxins in *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* reference materials. *Toxicon* **2012**, *60*, 1117–1134.
52. Fast, M.; Cembella, A.; Ross, N. *In vitro* transformation of paralytic shellfish toxins in the clams *Mya arenaria* and *Protothaca staminea*. *Harmful Algae* **2006**, *5*, 79–90.
53. Lassus, P.; Amzil, Z.; Baron, R.; Séchet, V.; Barillé, L.; Abadie, E.; Bardouil, M.; Sibat, M.; Truquet, P.; Bereard, J.; *et al.* Modelling the accumulation of PSP toxins in Thau Lagoon oysters (*Crassostrea gigas*) from trials using mixed cultures of *Alexandrium catenella* and *Thalassiosira weissflogii*. *Aquat. Living Resour.* **2007**, *20*, 59–67.
54. Contreras, A.M.; Marsden, I.D.; Munro, M.H.G. Effects of short-term exposure to paralytic shellfish toxins on clearance rates and toxin uptake in five species of New Zealand bivalve. *Mar. Freshw. Res.* **2011**, *63*, 166–174.
55. Lopez-Barea, J.; Pueyo, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1998**, *399*, 3–15.
56. Hahn, M.E.; Stegeman, J.J. Regulation of Cytochrome P4501A1 in Teleosts: Sustained Induction of CYP1A1 mRNA, Protein, and Catalytic Activity by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran in the Marine Fish *Stenotomus chrysops*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1994**, *127*, 187–198.
57. Varanasi, U.; Stein, J.E.; Nishimoto, M.; Reichert, W.L.; Collier, T.K. Chemical carcinogenesis in feral fish: Uptake, activation, and detoxication of organic xenobiotics. *Environ. Health Perspect.* **1987**, *71*, 155–170.
58. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th ed.; AOAC: Washington, DC, USA, 2005; pp. 79–80.
59. Van de Riet, J.; Gibbs, R.S.; Muggah, P.M.; Rourke, W.A.; MacNeil, J.D.; Quilliam, M.A. Liquid Chromatography Post-Column Oxidation (PCOX) Method for the Determination of Paralytic Shellfish Toxins in Mussels, Clams, Oysters, and Scallops: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* **2011**, *94*, 1154–1176.
60. Garet, E.; Gonzalez-Fernandez, A.; Lago, J.; Vieites, J.M.; Cabado, A.G. Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunoassay and Reference Methods for the Detection of Shellfish Hydrophilic Toxins in Several Presentations of Seafood. *J. Agric. Food. Chem.* **2010**, *58*, 1410–1415.
61. Hara, Y.; Dong, J.; Ueda, U. Open-sandwich immunoassay for sensitive and broad-range detection of a shellfish toxin gonyautoxin. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *793*, 107–113.
62. Harrison, P.J.; Waters, R.E.; Taylor, F.J.R. A broad-spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* **1980**, *16*, 28–35.
63. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408.
64. Show, B.I.; Battle, H.I. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* **1957**, *35*, 325–347.
65. Bancroft, J.D.; Stevens, A. *Theory and Practice of Histological Techniques*, 4th ed.; Churchill Livingstone: Edinburgh, UK, 1996.
66. Ravn, H.; Anthoni, U.; Christophersen, C.; Nielsen, P.H.; Oshima, Y. Standardized extraction method for paralytic shellfish toxins in phytoplankton. *J. Appl. Phycol.* **1995**, *7*, 589–594.

67. Masselin, P.; Amzil, Z.; Abadie, E.; Nézan, E.; Le Bec, C.; Chiantella, C.; Truquet, P. Paralytic shellfish poisoning on the French Mediterranean coast in the autumn 1998: *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae) as causative agent. In *Harmful Algal Blooms 2000*; Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J., Eds.; JOC of UNESCO Publish: Paris, France, 2001; pp. 407–410.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

RESUME

En France, les sites ostréicoles de la méditerranée sont confrontés régulièrement à de fortes mortalités de juvéniles de *Crassostrea gigas* mais également à des efflorescences récurrentes du dinoflagellé producteur de toxines paralysantes (PSTs), *Alexandrium catenella*. Parmi les pathogènes associés de manière récurrente à ces mortalités, on retrouve des souches de *Vibrio* appartenant au clade Splendidus. Nous nous intéressons ici aux interactions entre *A. catenella* et l'huître *C. gigas* confrontée à des vibrios pathogènes. Dans une première partie, nous avons montré qu'en conditions expérimentales contrôlées, *A. catenella* augmentait la sensibilité de l'huître *C. gigas* au pathogène *Vibrio tasmaniensis* LGP32. *In situ*, nous avons également constaté la coïncidence entre la mortalité des huîtres en 2014 et la présence des PSTs dans leurs tissus. Dans une seconde partie, nous avons étudié les interactions entre les PSTs produites par *A. catenella* et les cellules immunitaires de l'huître, les hémocytes. Un résultat important de cette thèse a été de montrer que la saxitoxine, une des toxines produites par *A. catenella*, se lie à des structures granulaires présentes dans le cytoplasme des hémocytes de *C. gigas* et induit une mort hémocytaire caspases-dépendante. Cette mort est indépendante de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Nous avons également démontré que la toxine majoritaire des cellules d'*A. catenella*, la gonyautoxine 5, est la plus toxique sur les hémocytes de *C. gigas*. Parmi les populations hémocytaires touchées, les hyalinocytes sont très sensibles à ce stress toxique. Les hémocytes étant les cellules immunocompétentes de l'huître qui jouent le rôle central dans la défense contre les infections, nous supposons que leur mort cellulaire induite par les PSTs affecte négativement la défense des mollusques bivalves et explique l'augmentation de la susceptibilité des huîtres à l'infection par *Vibrio tasmaniensis* LGP32 quand elles sont exposées à *A. catenella*.

ABSTRACT

In France, oyster sites in the Mediterranean Sea are regularly confronted to high mortalities of *Crassostrea gigas* juveniles and to recurrent blooms of the dinoflagellate producer of Paralytic Shellfish Toxins (PSTs), *Alexandrium catenella*. Among the pathogens associated to these mortalities, we found *Vibrio* strains belonging to Splendidus clade. We here focus on the interactions between *A. catenella* and the oyster *C. gigas* challenged with pathogenic vibrios. In the first part of this work, we have shown that, *in vivo*, *A. catenella* increased the susceptibility of the oyster *C. gigas* to the pathogen *Vibrio tasmaniensis* LGP32. *In situ*, we also established the coincidence between oyster mortality in 2014 and the presence of PSTs in their tissues. In the second part of this work, we studied the interactions between the PSTs produced by *A. catenella* and oyster immune cells, the hemocytes. An important result of this thesis was that saxitoxin, a toxin produced by *A. catenella*, binds to granular structures in the cytoplasm of *C. gigas* hemocytes and induces their caspase-dependent cell death. This death is independent of the production of reactive oxygen species. We also demonstrated that the major toxin of *A. catenella* cells, the gonyautoxin 5, is the most toxic on *C. gigas* hemocytes. Among affected hemocyte populations, the hyalinocytes are very sensitive to this toxic stress. As hemocytes are oyster immunocompetent cells and therefore play the central role in the defense against infections, we can presume that their cell death induced by the PSTs negatively affects the defense of bivalve mollusks and explains the increased susceptibility of oysters to the infection by *Vibrio tasmaniensis* LGP32 when exposed to *A. catenella*.