



HAL
open science

Biologie, écologie et évolution du cancer transmissible MtrBTN2 des moules *Mytilus* sp

Maurine Hammel

► **To cite this version:**

Maurine Hammel. Biologie, écologie et évolution du cancer transmissible MtrBTN2 des moules *Mytilus* sp. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTG080 . tel-03604679

HAL Id: tel-03604679

<https://theses.hal.science/tel-03604679>

Submitted on 10 Mar 2022

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 DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Evolution des systèmes infectieux

École doctorale GAIA

Unités de recherche IHPE-UMR5244 et ISEM-UMR5554

Biologie, écologie et évolution
du cancer transmissible MtrBTN2
des moules *Mytilus* sp.

Présentée par Maurine HAMMEL

Le 10 décembre 2021

Sous la direction de Guillaume CHARRIERE
et Nicolas BIERNE

Devant le jury composé de

Dr. Christine COUSTAU, CNRS, Nice

Dr. Pierre BOUDRY, Ifremer, Plouzané

Dr. Christine CHEVILLON, CNRS, Montpellier

Dr. Natacha KREMER, CNRS, Lyon

Dr. Guillaume CHARRIERE, Université Montpellier, Montpellier

Dr. Nicolas BIERNE, CNRS, Montpellier

Rapportrice

Rapporteur

Présidente du jury

Examinatrice

Directeur de thèse

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Je souhaite remercier Christine Coustau, Pierre Boudry, Christine Chevillon et Natacha Kremer d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse Nathalie Charbonnel, Christine Braquart-Varnier, Guillaume Mitta et Yannick Guégen pour les différents échanges toujours très constructifs, votre disponibilité, votre écoute et votre bienveillance.

Les remerciements suivants seront pour mes deux directeurs de thèse Guillaume Charrière et Nicolas Bierne, sans qui je ne serais pas allée bien loin. Guillaume, merci de ne pas avoir pris peur le premier jour de ma thèse quand je t'ai demandé ce que voulais dire « les chiffres inscrits sur les pipettes » et après le petit plouf lors de la première sortie terrain, la suite a été un peu plus glorieuse je l'espère. Dans l'ensemble, merci pour tous les échanges que l'on a pu avoir sur la thèse, mais pas que. Nico, merci tout simplement d'avoir cru en moi, depuis le master jusqu'à aujourd'hui, quand je n'en étais pas capable moi-même. Tu as toujours eu les bons mots au bon moment, pour toutes les situations. Merci pour tous les échanges, le partage de ton enthousiasme et de ta culture scientifique infinie qui ont fini par me convaincre, entre autre, que les moules c'est cool. A vous deux, je vous remercie de m'avoir accompagné et soutenue pendant ces trois années pleines de challenges et de rebondissements !

Je pense pouvoir dire que cette thèse n'aurait pas été la même sans l'incroyable esprit de collaboration entre de nombreuses personnes qui travaillent sur les cancers, les bivalves et/ou les cancers de bivalves, en France et à travers le monde. Je me sens chanceuse d'avoir pu apprendre dans ce contexte et suis convaincue que la collaboration scientifique rendra la compréhension du monde qui nous entoure bien meilleure. Il y a donc nombreuses personnes à remercier, et j'essaierais de n'oublier personne.

Je remercie le laboratoire du LABEO et plus particulièrement Maryline Houssin de nous avoir toujours bien accueilli (de nombreuses fois !), et sans qui nous aurions difficilement eu accès au matériel biologique qui a permis de réaliser une bonne partie des expérimentations de cette thèse. Merci au mytiliculteur Benoît Clouet, pour l'ensemble des animaux fournis et sa disponibilité. Merci à Suzanne, Elise, Maud et Ludo de m'avoir transmis vos connaissances, d'avoir partagé votre coin de paillasse et quelques cafés. Une mention spéciale à Maud avec qui j'ai réalisé mon tout premier criblage cytologique et surtout partagé une superbe semaine de congrès AMMR, on se sera bien marrée moufette !

Je souhaite également remercier la station expérimentale Ifremer de Palavas et notamment Emmanuel Rezzouk, pour nous avoir accueilli de nombreuses fois. Merci à toutes les personnes que j'ai pu croiser et qui m'ont aidé et donné de nombreuses astuces expérimentales.

Merci à Lionel Degremont et Bruno Petton de nous avoir fourni de nombreux animaux très précieux pour les expérimentations de la thèse.

Merci à Ismaël Bernard du bureau d'étude Eurêka Mer pour les différents échantillonnages et les échanges scientifiques que l'on a pu avoir. Merci également à Hélène Cochet du bureau d'étude COCHET Environnement pour les échantillonnages.

Je souhaite également remercier Antonio Villalba et Michael Metzger. Merci pour tous les échanges que j'ai pu avoir avec chacun de vous et qui m'ont permis d'en apprendre beaucoup sur les cancers des bivalves en général. J'ai eu beaucoup de plaisir à collaborer avec vous et j'espère que cela continuera dans l'avenir, à travers de nouveaux projets.

Je me dois également de remercier la personne qui m'a fait découvrir le domaine du cancer en écologie et en évolution, Fred Thomas, sans qui je ne serais peut-être pas là à écrire ces mots. Merci de m'avoir transmis ta passion pendant mon stage de master 1 et au cours des échanges que l'on a eu ensuite. Je me dois également de remercier Tazio et Camille, merci pour les moments passés à discuter de science et d'autres choses, vous avez grandement participé à me faire voir le côté fascinant de la science.

J'en viens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai partagé mon quotidien au laboratoire, et qui ont toujours été disponibles pour discuter ou donner un gros coup de main en manip. J'ai eu la chance de faire partie de deux labos et de deux équipes, avec deux fois plus d'occasion d'échanger et d'apprendre (et de faire des réunions !), mais aussi deux fois plus d'opportunité de trinquer en fin de journée autour d'une bière ou d'un rosé.

Merci à toutes les personnes de l'IHPE, Delphine, Yannick, Guillaume M., Jérémie, Julien, Caro, Jean-Michel, Viviane, Agnès, Manu, Cristian, et toutes les personnes de Perpi, pour votre aide dans de multiples domaines (administration, analyses transcripto, rigueur dans les manips, protocoles, et j'en passe !). Mention spéciale pour Delphine car tu as été très impliquée dans cette thèse et je t'en remercie, mais aussi à l'équipe technique que j'ai souvent embêté, Philippe et Marco pour la mise en place des circuits d'eau (entre autre), Juliette pour les broyages et extractions d'ARN (un binôme efficace !), Gaëlle pour ton aide à Palavas et Océane pour tes trucs et astuces en tout genre. Une autre mention spéciale pour Diane, Eric et Anne pour tout le côté administratif, les commandes et les missions, que j'ai souvent du faire en urgence (merci pour votre disponibilité). Merci à toutes les personnes de l'ISEM que j'ai pu croiser dans les couloirs, à toute l'équipe BEM, Pierre-Alex., Fred V., Christine, Bruno, Fred, Stephen, Emilie, Nelly, pour les midis, les milles et unes discussions et tout le reste.

Qui dit deux labos, dit deux fois plus de doctorants avec qui partager des moments de fous ! La liste est longue mais sachez que vous avez fait de ces trois années de thèse des années incroyables. Je noterais que le mélange de générations de doctorants est vraiment important pour assumer que l'on passe par toutes les émotions pendant ces trois ans de formation ! Alors MERCI à mes chers Zouz de l'IHPE, Etienne, Daniel, Janan, Jean, Pierre-Louis, Cairé, Aurélie, Noémie, Laura, Sébastien, Laura, Hajar et tous ceux de Perpi que je n'ai malheureusement pas beaucoup croisé. Mais aussi MERCI à tous ceux de l'ISEM, Alexis, Maud, Pierre B., Adrien, Fanny, Marie, Laura, Elisa (meilleure stagiaire ;)), Marion et Salomé (BEM team for ever), Marjo, Manon, Yohan, Alice, Iago, Arthur, Myra, Loulou, ... et tous ceux avec qui j'ai pu partager une bière ou un week-end d'inté. Maud petite dédicace à toi pour ton soutien et tes mots rassurants quand j'étais en panique (j'ai transmis les conseils aux générations futures ^^), et Alexis pour toutes nos danses ratées (j'en ai encore mal au crâne !^^). J'ai trouvé en vous tous des personnes incroyables que je peux maintenant appelé amis. MERCI !!

Enfin, Erika, je pense que mes mots ne pourront pas transmettre toute la reconnaissance que j'ai envers toi. Tu as été une rencontre des plus marquantes, autant scientifiquement que personnellement et je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté !! Le duo choc des « Miss

Moules » !! Merci pour tous ces fous rires, au labo, pendant nos innombrables allers-retours à Caen (ma valise, ma valise !; on est dans bliiiiiizzzaaaarrrd !!), et en dehors !

Il y a les personnes avec qui on partage son quotidien au labo et ceux qu'on voit en dehors ou chez soi. La liste est également longue mais je vais essayer de tous vous remercier pour le soutien sans faille que vous m'avez apporté !

Je commencerais par mes supers Alcoolocs, LéoPool, Nathan, Taïna, Arthur et Salma. Je ne sais pas comment je peux résumer ces deux années passées avec vous tellement c'est fort. Merci pour cette ambiance au quotidien qui m'a notamment permis de survivre aux multiples confinements ! Taïna, mon chouchou, merci de m'avoir débloqué de plein de situations juste en te parlant, et pour tout le reste ! Salma, de nous avoir tous supporté, cette bande de thésard ! Taïna et Nathan pour ces dernières semaines où vous avez tout géré, jusqu'à la relecture des thèses ! Arthur et LP pour avoir pu partager avec vous ce fabuleux moment pas du tout stressant de la fin de thèse (--'). Vous avez tous fait de ces années des réussites parce que vous êtes tout simplement des personnes formidables.

Je souhaite remercier toutes les filles de Caractère_class pour ces années de danse. Jess, tu es une prof incroyable et bien plus que ça, tu as grandement participé à la construction de la femme que je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir offert ces moments d'évasion, ça a beaucoup participé à ma bonne santé mentale ! ^^

Touuuuuuus les copains en général ! Pour tout ce que vous représentez dans ma vie, je vous aime et je vous dis merci. Juju *alias* BB, Zozo, Tiph, Elo, Muffin, Sandrou, Bruna, Théo, Perlette, Gaétan, Zozo, Sylvain, Chaton <3, Auré, Tibo, Débo, Léa, Agnès, Marianne, Béchou, Tina, Tims, Marinette, Nadia, Laure, Arnaud, Dédé et tous les autres débrouqueurs, et toutes les personnes que j'oublie mais qui sont toutes aussi importantes. MERCI.

Bien entendu, il y a aussi la famille. Merci à toute la famille Hammel et Jean-Joseph pour votre soutien, vos encouragements, vos petits mots doux et vos petites attentions. Rien n'est passé inaperçu et tout a eu une importance. Papa, Maman, Loïs pour m'avoir encouragé et supporté depuis toujours (Sylvie et Sasha aussi !). Mamie pour ta curiosité concernant mon sujet de thèse (« et alors, elles vont bien tes p'tites moules ? ») et les milles moments partagés avec toi que j'apprécie tellement.

Je finirais par remercier la personne la plus importante dans ma vie, Salma. Merci pour tout. Merci d'être là, de me supporter, d'avoir supporté la distance, que l'on se soit permise de réaliser nos projets respectifs, et de construire nos rêves futurs. Merci pour ton amour tout simplement. Cette thèse tu la mérites tout autant, ma chère docteure en thésard de biologie !

Je dédicace ce manuscrit à mon incroyable grand-mère, Geneviève JJ

Liste des publications

Acceptées et en cours de préparation

Article 1 : Hammel, M., Simon, A., Arbiol, C., Villalba, A., Burioli, E. A. V., Pépin, J.-F., Lamy, J-B., Benabdelmouna, A., Bernard, I., Houssin, M., Charrière, G. M., Destoumieux-Garzon, D., Welch, J. J., Metzger, M. J., Bierne, N. (2022). Prevalence and polymorphism of a mussel transmissible cancer in Europe. *Molecular Ecology*, 31(3), 736-751. <https://doi.org/10.1111/MEC.16052>

Article 2 : Hammel M., Paradis L., Chailler E., Bernard I., Coquet H., Burioli E. A. V., Simon A., Thomas F., Destoumieux-Garzon D., Charrière G. M., Bierne N.. *In preparation*. Environmental correlates of MtrBTN2 prevalence suggest ports are epidemiological hubs for this marine transmissible cancer.

Article 3 : Yonemitsu M.A., Giersch R.M., Polo-Prieto M., Hammel M., Simon A., Cremonte F., Avilés F.T., Merino-Véliz N., Burioli E.A.V., Muttray A.F., Sherry J., Reinisch C., Baldwin S.A., Goff S.P., Houssin M., Arriagada G., Vázquez N., Bierne N., Metzger M.J. (2019) A single clonal lineage of transmissible cancer identified in two marine mussel species in South America and Europe. *ELife* 8, 1029. <https://doi.org/10.7554/eLife.47788>

Article 4 : Burioli E.A.V., Hammel M., Bierne N., Thomas F., Houssin M., Destoumieux-Garzón D., Charrière G.M. (2021) Traits of a mussel transmissible cancer are reminiscent of a parasitic life style. *Sci. Rep.* 11, 24110. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03598-w>

Table des matières

Introduction	3
1. Quelques généralités sur le cancer	5
1.1 Un processus inhérent à la multicellularité.	5
1.2 Un processus darwinien.....	7
1.3 Un micro-parasite agissant à plusieurs échelles	15
2. Au-delà de l'hôte : le cas des cancers transmissibles	16
2.1 Définition.....	16
2.2 Détection.....	18
2.3 Exploration des cas connus	18
3. Modèle d'étude : moules du genre <i>Mytilus</i> sp. et leur cancer transmissible	29
3.1 Le complexe d'espèce <i>Mytilus edulis</i> et son écologie	29
3.2 Morphologie, anatomie et physiologie.....	31
3.3 Cycle biologique	33
3.4 Immunité.....	34
4. Contexte, problématiques et objectifs de la thèse	46
Chapitre 1 : A la recherche des cancers transmissibles de moules <i>Mytilus</i> en Europe	51
1. Contexte et objectifs.....	53
2. Résumé de l'article	53
3. Article 1	54
Chapitre 2 : Distribution et prévalence du cancer transmissible MtrBTN2 dans une zone hybride de moules <i>Mytilus</i> en Bretagne Sud	81
1. Contexte et objectifs.....	83
2. Résumé de l'article	83
3. Article 2	84
Chapitre 3 : Caractérisation de la réponse anticancéreuse chez les moules <i>Mytilus</i> : combinaison d'histopathologie et de transcriptomique	109
1. Introduction, contexte et objectifs	111
2. Matériel et méthodes	112
2.1 Obtention du matériel biologique (J-5 à J-1).....	112

2.2	Expérimentation de transplant (jour J).....	113
2.3	Maintien des animaux (J0 à J24)	115
2.4	Prélèvement des individus receveurs (J25).....	115
2.5	Statut pathologique : scores cytologique et histologique	115
2.6	Broyage et extraction d'ARN.....	117
2.7	Traitement des données RNAseq	117
2.8	Reannotation rapide du génome de référence.....	118
2.9	Analyses des données RNAseq.....	118
3.	Résultats	118
3.1	Faible mortalités au cours de l'expérimentation	118
3.2	Observation cytologiques et histologiques.....	120
3.3	Statut pathologique et profil transcriptomique	122
4.	Discussion	128
5.	Figures supplémentaires	133
	Dicussion générale et perspectives	143
	Annexe 1 : Article 3 - A single clonal lineage of transmissible cancer identified in two marine mussel species in South America and Europe	157
	Annexe 2 : Etude de la réponse des moules <i>Mytilus edulis</i> à l'allogreffe et la xenogreffe d'hémocytes sains	181
	Annexe 3 : Article 4 - Transmissible cancerous cells evolved adaptations to a marine parasitic lifestyle in mussels	187
	Références bibliographiques	201

---- Introduction ----

1. Quelques généralités sur le cancer

1.1 Un processus inhérent à la multicellularité.

L'apparition de la multicellularité a imposé une coopération entre cellules maximisant la valeur sélective¹ de la communauté de cellules composant l'organisme et non plus celle d'une cellule isolée. Cette transition majeure dans l'histoire évolutive des organismes (Buss, 1987; Szathmáry & Maynard Smith, 1995), survenue plusieurs fois indépendamment (Knoll, 2011; Niklas & Newman, 2013), a été permise par l'acquisition de mécanismes de régulation et de maintien de la coopération cellulaire. Les « fondements de la multicellularité » se résument ainsi en cinq mécanismes que sont : (i) l'inhibition de la prolifération, (ii) le contrôle de la mort cellulaire, (iii) la réallocation des ressources, (iv) la division des tâches et (v) la création et le maintien de l'environnement extracellulaire (Aktipis et al., 2015, [FIGURE 1](#)). Toute altération de ces fonctions peut entraîner le basculement d'un comportement cellulaire altruiste vers un comportement égoïste, favorisant ainsi la valeur sélective de la cellule au dépend de celle de l'organisme. Ce processus est plus communément nommé sous le terme de cancer² ou néoplasie³ et est observé dans une large diversité d'organismes multicellulaire actuels (des hydres aux baleines en passant par les plantes, Albuquerque et al., 2018 ; Dodueva et al., 2020) et quelques fossiles (dinosaures, Dumbrovă et al., 2016; Rothschild et al., 1998).

A l'instar de la multicellularité, le processus cancéreux est caractérisé par l'acquisition successive de dix caractéristiques (nommées *hallmarks*), que sont : (i) l'autosuffisance des signaux de croissance, (ii) l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, (iii) la capacité à éviter l'apoptose⁴, (iv) la capacité de se répliquer à l'infini, (v) l'induction de l'angiogénèse⁵, (vi) la capacité à former des métastases⁶, (vii) le dérèglement du métabolisme énergétique cellulaire, (viii) l'évitement d'une destruction par le système immunitaire, (ix) la promotion de l'inflammation et (x) l'instabilité génomique et mutabilité (Hanahan et Weinberg, 2000, 2011, [FIGURE 2](#)). Ainsi, le processus cancéreux démarre à la suite de modifications

¹ La valeur sélective d'une entité biologique correspond à la mesure de sa contribution aux générations futures. La valeur sélective se regarde à différente échelle, celle d'un allèle, d'un génotype, d'une cellule et d'un individu, entre autre. En d'autre terme, c'est la mesure de la capacité d'un individu (ou entité biologique) à se reproduire.

² Le mot cancer est issu du mot latin *karkinos/karkinoma* qui signifie crabe. Ce nom a été donné par Hippocrate (460-377 av JC) par analogie entre les extensions de la tumeur et les longs appendices du crabe.

³ Composé de *néo* « nouveau » et *plasie* « croissance » ce qui signifie littéralement « nouvelle croissance ».

⁴ L'apoptose est le mécanisme de mort cellulaire programmée.

⁵ L'angiogénèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants.

⁶ Dès lors que des cellules cancéreuses d'une tumeur migrent par voie sanguine ou lymphatique dans d'autres parties du corps, on parle de métastase (mot issu du grec *metastasis* qui signifie « changement, déplacement »)

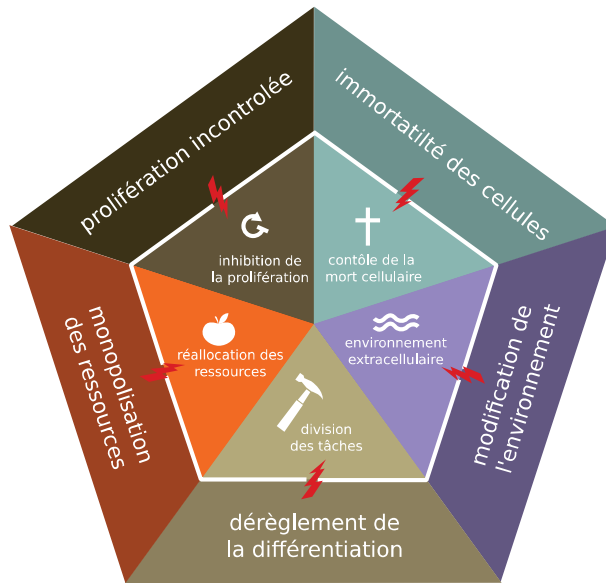


FIGURE 1 : Les cinq fondements de la multicellularité. La coopération entre cellules nécessite les caractéristiques indiquées dans l'intérieur du pentagone. Toute perturbation de ces fondements (éclair rouge) entraînant des modifications de fonction (extérieur du pentagone) est caractéristique du développement cancéreux (modifié de Aktipis et al., 2015)

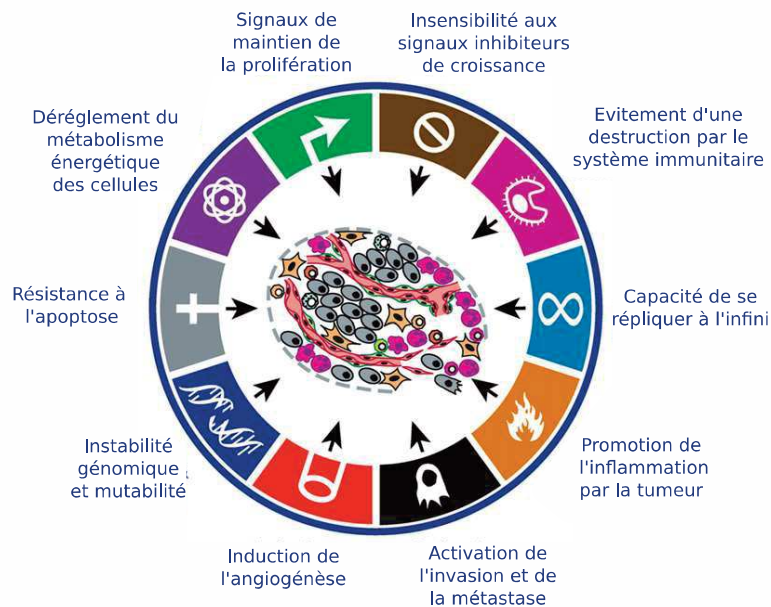


FIGURE 2 : Les dix hallmarks du cancer. Les dix dérèglements fonctionnels qui induisent et favorisent la croissance tumorale (modifié de Hanahan & Weinberg, 2011)

génétiques spécifiques (Aktipis & Nesse, 2012) qui vont entraîner une prolifération anormale des cellules. L'établissement de la tumeur ou néoplasme dépendra ensuite de sa capacité à échapper au système immunitaire et à produire un environnement favorable pour sa croissance et son expansion. L'enchaînement des différentes étapes depuis les premières lésions précancéreuses jusqu'à la métastase suit un processus darwinien (Cairns, 1975; Nowell, 1976), nommé la « cascade métastatique » commune à tous les cancers (Nguyen, Bos, & Massagué, 2009).

Il existe différents types de cancers (plus de 200 chez l'Homme) qui peuvent être classés en quatre catégories selon la nature du tissu d'origine. Les carcinomes se développent à partir de cellules d'un tissu épithélial qui constitue la couche protectrice des organes soit en contact avec le milieu extérieur (peau, poumon, intestin) soit en contact avec les tissus mésenchymateux (prostate, sein, pancréas, foie etc.). Les carcinomes représentent 80% des cancers humains. Les sarcomes, moins fréquents, proviennent de cellules des tissus conjonctifs⁷ tels que les os, le cartilage et autres tissus de soutien. Ces deux types de cancers forment des amas de cellules localisés dans un tissu qui s'organise en une structure complexe que l'on appelle des tumeurs solides. Ils peuvent évoluer en cancers métastatiques ou disséminés dès lors que des cellules cancéreuses migrent dans les systèmes sanguin ou lymphatique et colonisent d'autres organes. Par opposition aux tumeurs solides, il existe d'autres types de cancers dont l'origine est hématopoïétique⁸ et pour lesquelles les cellules cancéreuses circulent dans l'organisme via les systèmes sanguin et lymphatique⁹. Par définition ces cancers ne deviennent pas métastatiques et sont appelés tumeurs liquides. Ils sont classés en trois catégories en fonction du site de prolifération des cellules cancéreuses : les leucémies, cancers dans le sang et la moelle osseuse ; les lymphomes, cancers dans les organes lymphoïdes ; et les myélomes, cancers dans la moelle osseuse.

1.2 Un processus darwinien

1.2.1 Initiation

Tout au long de la vie et des divisions des cellules, des perturbations de leur matériel génétique s'accumulent par des phénomènes de mutations somatiques, telles que des changements nucléotidiques (mutation ponctuelle), des insertions ou des délétions, des amplifications géniques, des pertes de fragments ou des réarrangements chromosomiques. Lorsqu'elles touchent certains gènes en particulier,

⁷ Le tissu conjonctif est le tissu qui soutient et lie différents types de tissus et d'organes du corps.

⁸ L'hématopoïèse est le processus physiologique de production des cellules sanguines.

⁹ Le système lymphatique est constitué de vaisseaux lymphatiques et de ganglions lymphatiques, et contribue à la circulation des nutriments, la circulation des hormones et est un élément essentiel du système immunitaire.

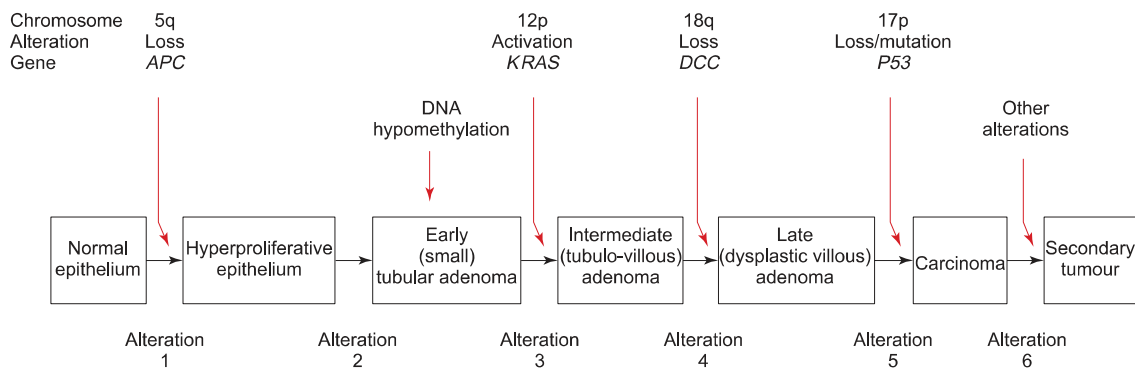


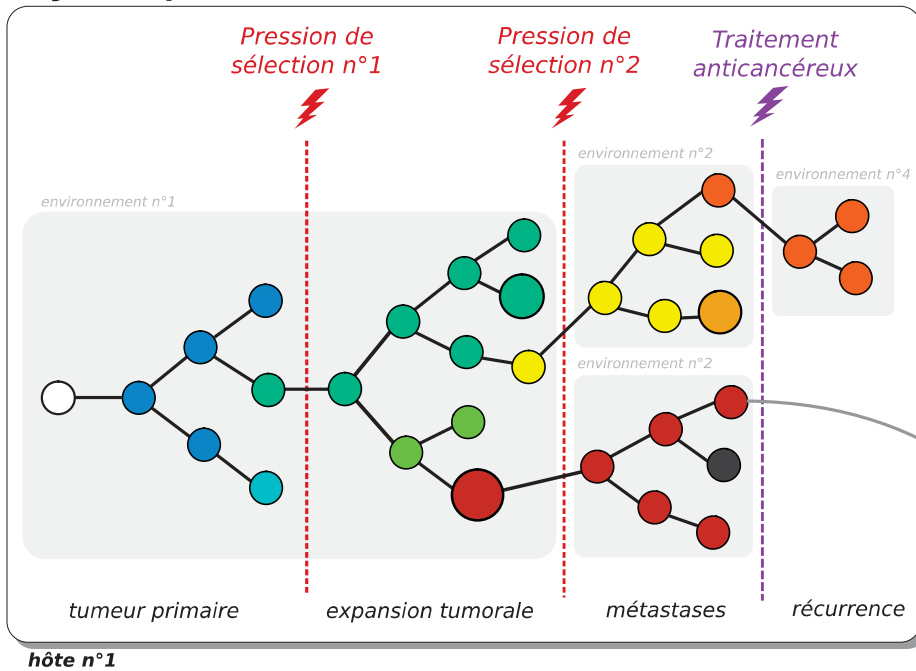
FIGURE 3 : Modèle de la progression du cancer colorectal. Succession de six altérations génétiques qui mène d'un épithélium normal à une tumeur métastatique (figure tirée de Riedel, 2007)

ces altérations peuvent amener au processus de transformation cellulaire qui se caractérise notamment par une perte d'inhibition de contact, une acquisition de résistance à l'apoptose et une perte de régulation normale du cycle cellulaire, rendant ainsi la cellule immortelle. Deux catégories de gènes impliqués dans ces processus se distinguent. D'un côté, les proto-oncogènes qui favorisent la transformation cellulaire et les processus cancéreux, et de l'autre, les suppresseurs de tumeurs, qui assurent le maintien de la cellule dans un état différencié et fonctionnel.

Les proto-oncogènes vont devenir des oncogènes à la suite de mutations qui vont modifier leur activité. Ils sont généralement impliqués dans l'accélération de la prolifération cellulaire, de la croissance tumorale et du processus métastatique. La majorité des proto-oncogènes sont impliqués dans l'activation du cycle cellulaire et le maintien des cellules dans un état non-différencié, l'inhibition de l'apoptose, et ils favorisent la migration cellulaire. Un exemple emblématique de proto-oncogène est le cas du gène *RAS*, qui code pour une protéine régulatrice de voies de signalisation impliquées dans le cycle cellulaire, et qui concerne de nombreux cancers humains (carcinomes dont ceux du pancréas, du colon mais aussi certaines leucémies, [Bos, 1989](#)). Les gènes suppresseurs de tumeurs (véritables gardiens des cellules) sont des gènes impliqués dans l'inhibition de la division cellulaire et le maintien de l'état indifférencié, l'activation de l'apoptose et la réparation des dommages de l'ADN. On distingue les *gatekeepers* (impliqués dans la régulation du cycle cellulaire), dont la perte de fonction favorise directement la prolifération incontrôlée, et les *caretakers* (impliqués dans le contrôle de l'intégrité du génome) dont la perte de fonction déclenche une accumulation des mutations qui peuvent être favorables au développement cancéreux lorsque celles-ci modifient également l'activité de proto-oncogènes. On peut citer l'exemple emblématique du gène *p53/TP53*, qui code pour un facteur de transcription majeur dans la régulation de l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'induction de l'apoptose suite à des cassures dans les brins d'ADN, et dont la perte de fonction est impliquée dans un grand nombre de cancers humains (lymphomes, sarcomes, comme le cancer du cerveau et du sein, [Fridman & Lowe, 2003](#); [Hollstein et al., 1991](#); [Levine, 1997](#)). Il est communément admis que, pour un gène favorisant le cancer lorsqu'il est activé (proto-oncogène), la mutation d'une seule copie homologue peut suffire, tandis que pour un gène qui freine le cancer (suppresseur de tumeur), les deux copies du gène doivent être inactivées (*two-hits hypothesis*, [Knudson, 1971](#)). Cependant, le processus cancéreux n'est généralement pas le résultat d'une simple modification à un seul gène mais celui d'un ensemble de modifications successives qui conduisent à une prolifération cellulaire incontrôlée ([Knudson, 2001](#); [Ashley, 1969](#)). C'est par exemple le cas du cancer colorectal pour lequel la succession d'au moins six mutations est nécessaire, incluant les gènes *APC*, *RAS* et *TP53* ([FIGURE 3](#), [Fearon & Vogelstein, 1990](#)).

Les altérations génétiques à l'initiation du processus cancéreux peuvent être la conséquence conjointe du hasard (« bad-luck », [Noble et al., 2016](#); [Nowak & Waclaw, 2017](#)), d'une exposition à des agents mutagènes de l'environnement (physique, chimique ou infectieux) ou de prédispositions génétiques - des mutations héréditaires qui raccourcissent la chaîne de mutations qui mène à l'oncogénèse ([Langie et al., 2015](#)). Le cancer est toujours un tirage aléatoire de mauvaises mutations (de la « bad luck ») mais l'environnement ou les gènes influencent plus ou moins le processus. Les agents mutagènes externes peuvent être d'origine physique (rayonnement Ultraviolet, [De Gruijl, 1999](#)) ou chimique (par exemple l'arylamines, [Vineis, 1994](#)) et concernent des cancers chez l'Homme ([De Coster et al., 2008](#)), mais également chez les oiseaux ([Møller, Bonisoli-Alquati, & Mousseau, 2013](#)) et chez de nombreuses espèces aquatiques ([Baines et al., 2021](#); [Sweet et al., 2012](#)), entre autre. Les agents biologiques (virus, bactéries et parasites) peuvent également être mutagènes et représentent une part non négligeable de cancers humains (20%, [Dalton-Griffin & Kellam, 2009](#)) et de cancers chez d'autres espèces comme chez les lapins ou les chats ([Albuquerque et al., 2018](#)). Ces agents transformants peuvent provoquer une prolifération incontrôlée soit directement en s'intégrant dans le génome d'une cellule et en modifiant l'activité d'un oncogène, en inhibant un gène suppresseur de tumeurs ou en stimulant de la mitose (comme par exemple le papillomavirus humain dans le cancer du col de l'utérus, [Schiffman et al., 2007](#)), soit indirectement en provoquant une immunosuppression ou une inflammation chronique, comme c'est la cas de la bactérie *Helicobacter pylori* dans les cancers gastriques humains ([Parsonnet et al., 2010](#)). Bien que l'implication de ces facteurs extérieurs soit significative, la part du hasard dans l'accumulation des mutations oncogènes a tendance à être oubliée, donnant l'impression que le cancer est une maladie due à un mauvais environnement (mauvaise alimentation, exposition aux substances cancérigènes, etc.). [Tomasetti et al. \(2015, 2017\)](#) ont remis en avant le rôle du hasard en montrant que le nombre de division cellulaire d'un organe est corrélé avec l'incidence cancéreuse, et cela de manière plus prononcée que certains facteurs extérieurs. Enfin, certaines mutations touchant des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs peuvent être héritées. En partant avec une ou plusieurs mutations d'avance sur le processus mutationnel menant à l'oncogénèse, elles augmentent les risques et favorisent ainsi le développement d'un cancer (la quantité de mutations à accumuler pour initier un cancer se trouve amoindri). C'est le cas des gènes suppresseurs de tumeurs *BRCA1* et *BRCA2*, qui codent pour des protéines régulatrices du cycle de division cellulaire, et dont la perte de fonction est impliquée dans les cancers humains du sein et de l'ovaire ([Venkitaraman, 2002](#)).

Dynamique intra-hôte



Dynamique inter-hôte

(cancers transmissibles)

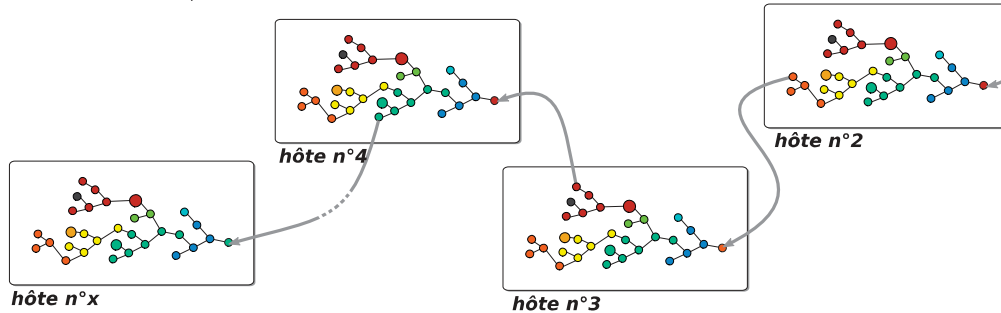


FIGURE 4 : Représentation schématique de l'évolution clonale cancéreuse. Les différents clones sont représentés par les cercles de couleurs différentes. Les différentes pressions de sélection ou traitement anticancéreux sont à la base de la sélection clonale dans les différents environnements tumoraux. La dynamique intra-hôte est applicable à tous les cancers. Dans le cas de cancers transmissibles cette dynamique s'étend à l'échelle de plusieurs hôtes.

1.2.2 Evolution clonale

Le principe de l'évolution darwinienne repose sur des entités répliquatives qui se distinguent par une certaine variabilité (acquise aléatoirement) et où tout changement favorisant la reproduction d'un variant dans un environnement donné est sélectionné. Elle régit l'évolution de l'ensemble des organismes vivants et peut également s'appliquer au cancer (Cairns, 1975; Greaves & Maley, 2012; Nowell, 1976). En effet, le cancer démarre à la suite d'altérations des systèmes de régulation qui maintiennent l'homéostasie cellulaire et notamment les systèmes de réparation de l'ADN ou de régulation du cycle cellulaire. Dès lors que ces systèmes sont défectueux, les mutations somatiques s'accumulent aléatoirement à chaque division cellulaire et entraînent une hétérogénéité entre les clones cancéreux (forte instabilité génétique). De cette diversité clonale seront sélectionnés les variants dont les changements génétiques ou épigénétiques entraînent un changement phénotypique qui favorise leur reproduction dans un microenvironnement donné. On distingue les mutations *drivers* qui vont conférer un avantage sélectif dans un environnement tumoral particulier à un temps donné, et des mutations *passengers* qui sont neutres, ou légèrement délétères, c'est-à-dire sans influence forte sur le phénotype et qui sont majoritaires. Dans une taille de population cellulaire réduite, la dérive génétique¹⁰ aura également un rôle dans l'évolution clonale des cancers.

Ce processus d'évolution clonale est dynamique et les pressions de sélection peuvent venir de l'environnement tissulaire de l'organisme, de l'environnement tumoral lui-même ou des traitements thérapeutiques anti-cancéreux par exemple (FIGURE 4). Cette évolution clonale est donc influencée par la constitution génétique des cellules de l'hôte, les régulateurs systémiques (nutriments, hormones), les régulateurs locaux et les contraintes architecturales. Tous ces paramètres sont également influencés par le mode de vie de l'organisme qui héberge le cancer (exposition aux ultra-violets, infections, etc., voir section 1.2.1). D'autre part, l'organisation complexe des tumeurs¹¹ rend l'accès aux ressources inégales entre cellules cancéreuses d'une même tumeur. Par exemple, les cellules proches des vaisseaux sanguins qui irriguent la tumeur¹² auront un apport en oxygène important et celles éloignées subiront un environnement anoxique (Chouaib et al., 2012). Il est important de noter que les interactions entre la

¹⁰ C'est la modification aléatoire des fréquences alléliques dans une population. En d'autres termes, c'est la perte d'un individu (et de son pool de gènes) suite à un phénomène stochastique qui est indépendant de sa capacité à survivre ou se reproduire dans un environnement donné.

¹¹ La croissance tumorale est caractérisée par différentes étapes: émergence, tumeur primaire, diversification, organisation pour l'accès aux nutriments et à l'oxygène (angiogénèse) et *in fine* la métastase. Ainsi, la tumeur est un ensemble complexe qui regroupe les cellules cancéreuses, des vaisseaux sanguins mais également des cellules de l'hôte (stroma).

¹² Les vaisseaux irriguant les tumeurs sont issus du processus d'angiogénèse.

tumeur et l'hôte sont bidirectionnelles et que les cellules cancéreuses participent également à la modification de leur microenvironnement à leur avantage (concept de construction de niche¹³). Enfin, les différents traitements thérapeutiques appliquent une pression de sélection énorme qui vont éliminer la majorité des variants cancéreux tout en sélectionnant les clones résistants (souvent multi-résistants, [FIGURE 4](#)). On comprend bien alors l'enjeu majeur de la dynamique évolutive des tumeurs dans la compréhension des cancers et du succès des traitements.

1.2.3 Prévention-défense de l'organisme et réponse du cancer

Contrairement à ce que l'on pourrait s'imaginer, les systèmes multicellulaires sont très efficaces face au cancer. Comme nous venons de le voir, le processus cancéreux résulte de l'évolution d'un comportement tricheur au sein d'un organisme multicellulaire. La tricherie n'est pas nouvelle et durant des milliers d'années d'évolution¹⁴, la sélection naturelle a favorisé la coopération entre cellules, et a mené à des organismes avec un nombre de cellules de plus en plus important ([Domazet-Lošo & Tautz, 2010](#)). Pour cela des mécanismes visant à détecter, limiter et éliminer les cellules tricheuses ont donc été sélectionnés. Ils ont, pour la plupart, été évoqués précédemment puisque ce sont ces mêmes mécanismes qui, une fois altérés, sont à l'origine des cancers. Au niveau cellulaire, il s'agit de l'apoptose, la sénescence des cellules¹⁵, la réparation de l'ADN, le maintien du code épigénétique¹⁶ et le raccourcissement des télomères¹⁷ ([DeGregori, 2011](#)). Une autre barrière face au cancer est l'existence de cellules souches. Ce sont des cellules indifférenciées avec une durée de vie longue qui conservent la capacité à se diviser et à donner naissance à différents types cellulaires pour assurer le renouvellement des tissus et le maintien de leurs fonctions. L'existence de cellules souches tissulaires (en nombre limité chez l'adulte) à partir desquelles dérivent les cellules différenciées permet, entre autres, de contrôler et minimiser la longueur des lignages cellulaires en termes de nombre de divisions. Cela permet de diminuer les risques d'apparition de dommages génétiques et donc la potentielle initiation d'un processus cancéreux ([Leroi, Koufopanou, & Burt, 2003](#); [Merlo et al., 2006](#)). Les contraintes du microenvironnement tissulaire peuvent également prévenir l'apparition de tumeurs en limitant par

¹³ Le concept de construction de niche est issu de la biologie évolutive et de l'écologie. C'est un processus par lequel un organisme va modifier son environnement, généralement de manière à favoriser sa croissance et sa reproduction.

¹⁴ L'apparition de la multicellularité serait datée d'au moins 2 milliards d'années dans la période géologique de l'Ediacaran (Précambrien).

¹⁵ La sénescence cellulaire est un processus qui entraîne une lente dégradation des fonctions de la cellule.

¹⁶ Le code épigénétique constitue l'ensemble des modifications épigénétiques spécifiques de chaque cellule et tissus d'un organisme eukaryote (par exemple: modifications des histones et de la méthylation de l'ADN).

¹⁷ Les télomères sont les extrémités des chromosomes qui se voient endommagées à chaque division cellulaire.

exemple l'accès à l'oxygène et aux ressources (DeGregori, 2011; Gatenby & Gillies, 2008). Si ces mécanismes cellulaires et tissulaires jouent un rôle préventif face au cancer, d'autres agissent une fois le processus enclenché. Le système immunitaire est une barrière majeure qui défend l'organisme des invasions par des agents pathogènes mais également face au cancer (Burnet, 1971; Corthay, 2014; Koebel et al., 2007; L. Thomas, 1982). A ses dépens, l'immunité peut également promouvoir la croissance tumorale et ce rôle paradoxal est résumé par le concept de *l'immunoediting* (Dunn, Bruce, Ikeda, Old, & Schreiber, 2002). Les interactions entre les tumeurs et le système immunitaire s'effectuent selon trois phases, la première phase est une phase d'élimination des cellules cancéreuses suite à leur reconnaissance par les effecteurs de l'immunité innée et acquise. La seconde phase est la phase d'équilibre où, lorsque l'intégralité des cellules tumorales n'a pas été éliminée au cours de la phase précédente, le taux de renouvellement et d'apparition de variants tumoraux est en équilibre avec le taux d'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire. Durant cette phase, qui peut durer plusieurs années, les cellules cancéreuses accumulent de nouvelles mutations qui pourront leur permettre à terme d'échapper au contrôle par le système immunitaire. Au cours de la dernière phase, la phase d'échappement, la croissance tumorale dépasse les capacités de contrôle par le système immunitaire et la croissance de la tumeur s'accélère, favorisant la mise en place de processus d'envahissement et de métastases. La plupart du temps, la phase d'élimination est concluante ou la durée de la phase d'équilibre très longue (dépassant l'espérance de vie d'un individu) et le cancer ne va pas se déclarer. Notons que, chez les vertébrés, les mécanismes d'immunité anticancéreuse reposent principalement sur des mécanismes de l'immunité acquise (comme les molécules du CMH et diverses populations de lymphocytes) et que l'immunité anticancéreuse des invertébrés reste très mal connue.

Une taille et une durée de vie plus importante devrait augmenter les risques de cancer¹⁸, mais ceci n'est pas vérifié dans la nature (*Peto's paradox*, Peto et al., 1975). Ce paradoxe suggère que, pour des organismes de grande taille et à durée de vie longue, des mécanismes complémentaires ont pu être sélectionnés au cours de leur évolution pour contrer le cancer (Caulin & Maley, 2011; Roche et al., 2012). C'est par exemple le cas chez l'éléphant où l'augmentation de taille du corps est associée à un plus grand nombre de copie du gène *p53* (suppresseur de tumeur) ce qui assure une meilleure réparation de l'ADN, diminue le risque de perte de fonction par mutations, et limite donc le développement cancéreux (Sulak et al., 2016). D'autres géants, comme la baleine bleue, ou les espèces longévives, comme le rat taupe, ont développé d'autres types de résistance contre le cancer, mais toujours en jouant sur le contrôle du taux de mutation somatique grâce aux systèmes de réparation de l'ADN ou le contrôle immunitaire

¹⁸ La taille est relative au nombre de cellules et la durée de vie à la probabilité d'accumuler des mutations.

(Nunney, 2020). Cette illustration renforce l'idée que les organismes multicellulaires sont bien armés contre le cancer.

Cependant, et nous le savons bien, le risque de cancer est loin d'être nul. Il n'existe pas de système sans faille surtout quand celui-ci est dynamique. La tricherie peut opérer et le cancer arrive parfois à contourner les mécanismes de défenses de l'hôte. En effet, le cancer peut notamment modifier le microenvironnement tumoral en sa faveur (phénomène d'angiogénèse, Nishida et al., 2006) ou échapper au système immunitaire (régulation négative d'antigène de reconnaissance par exemple, Vinay et al., 2015). De plus, la sélection naturelle, qui ne fait que maximiser le succès reproducteur d'un individu, n'aura qu'une action très limitée dans les périodes post-reproductives des hôtes. L'efficacité du système de prévention sera donc affectée par les limites de cette force évolutive. C'est ce qui pourrait expliquer l'augmentation des risques cancéreux dès la période reproductive achevée (DeGregori, 2011). Il existe cependant des espèces qui ont des risques de cancer limités malgré une reproduction terminée (Brown & Aktipis, 2015) mais cela va dans le sens de l'argument proposé. Ce phénomène peut s'expliquer par la valeur sélective inclusive¹⁹ où un soin prolongé aux petits par les parents ou individus apparentés (par exemple, les grands-parents) augmente la survie des jeunes et assure une meilleure transmission des gènes (Euler, 2011). Ainsi, les individus pouvant apporter de tel soins post-reproduction seront sélectionnés et avec eux les mécanismes de défense face au cancer, entre autre (Boutry et al., 2020). Pour finir, certaines mutations favorisant le développement cancéreux peuvent avoir des avantages pour les organismes (pléiotropie antagoniste) et donc ne pas être éliminées. C'est le cas de mutations héritées sur BRCA1 et BRCA2 qui augmentent la fertilité des femmes tout en les exposant à un risque accru de cancer des seins et des ovaires (Smith et al., 2012).

1.3 Un micro-parasite agissant à plusieurs échelles

En différents points, le cancer est comparable à un parasite (Ujvari et al., 2016). En effet, un parasite dépend de son hôte pour acquérir des ressources et assurer sa croissance et sa reproduction. Pour maximiser sa transmission, il peut manipuler le métabolisme cellulaire (exemple de l'agent de la leishmaniose viscérale, Moreira et al., 2015; Zuzarte-Luís & Mota, 2018) et le comportement de son hôte (exemple des « grillons suicidaires » Thomas et al., 2002 ; Heil, 2016; Hughes & Libersat, 2019; Poulin, 2010) et adopter des stratégies d'évitement du système immunitaire (exemple de la malaria chez le moustique, Molina-Cruz et al., 2013; Schmid-Hempel, 2008), entre autre. De la même manière, les hôtes

¹⁹ La valeur sélective inclusive représente la somme de la valeur sélective propre à l'individu et des bénéfices obtenus en aidant des génotypes apparentés.

peuvent adopter des stratégies compensatoires pour se défendre directement (via les barrières du système immunitaire), ou limiter l'impact de l'invasion parasitaire si celle-ci est inévitable (réallocation des ressources pour la reproduction immédiate, [Minchella & Loverde, 1981](#)). Nous avons vu précédemment les différentes défenses de l'hôte et les contournements du cancer pour y faire face, qui sont en tout point comparables avec ceux exposés ici. Le cancer peut donc avoir de multiples impacts sur les traits d'histoire de vie des organismes hôtes, bien que ces aspects soient encore peu étudiés. Un exemple est l'avancement du pic de ponte des femelles et une mort plus précoce chez la mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*) dans lesquelles un cancer du tractus digestif a été artificiellement induit ([Arnal et al., 2017](#)). Ainsi, au-delà de l'impact sur l'organisme hôte, le cancer semble important à prendre en considération dans la compréhension de l'évolution des espèces mais également des écosystèmes ([Perret et al., 2020](#); [Tissot, 2017](#); [Vittecoq et al., 2013](#)).

Dans un système où les deux protagonistes évoluent, chacun favorisera sa survie et sa reproduction dans une véritable course aux armements (théorie de la Reine Rouge). Dans la majorité des cancers, la coévolution hôte-cancer est limitée en temps (au maximum égale à l'espérance de vie de l'hôte) et recommence indépendamment à chaque fois. Cependant, l'existence de cancers transmissibles change notre regard sur cette dynamique de coévolution hôte-cancer qui peut parfois se faire sur plusieurs milliers d'années.

2. Au-delà de l'hôte : le cas des cancers transmissibles

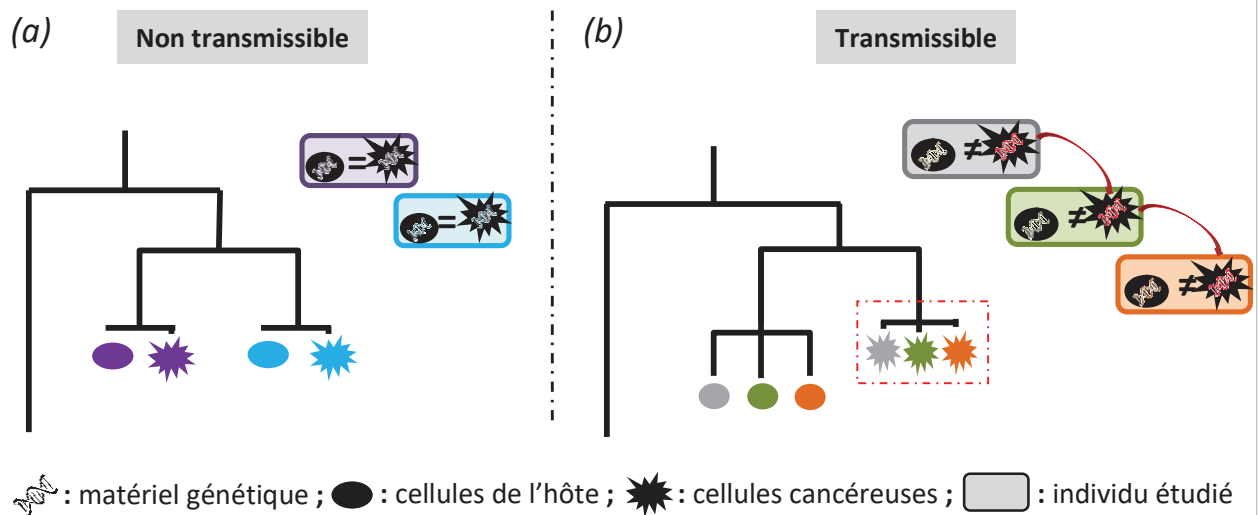
2.1 Définition

Nous venons de voir les caractéristiques du processus cancéreux, ce qui en est sa cause et les impacts sur l'organisme qui l'héberge. Dans la grande majorité des cas, le processus cancéreux est un cul de sac évolutif puisque la lignée cancéreuse va s'éteindre à la mort ou à la guérison de l'organisme hôte. Certains cancers ont cependant acquis la capacité à se transmettre à d'autres individus par transfert des cellules cancéreuses elles-même, tel une métastase à l'échelle de plusieurs hôtes ([FIGURE 4](#)). C'est ce que l'on nomme les cancers transmissibles²⁰. L'individu originel (duquel la lignée transmissible a émergé) est nommé l'« hôte fondateur ». Les notions présentées dans la partie précédente s'appliquent à ces cancers particuliers, à une exception près, qu'il provient d'un autre individu (voir d'une autre espèce). La dynamique évolutive de ces cancers, du fait de leur transmission, se rapproche d'autant plus de celles des parasites mais avec la particularité d'une forte similarité génomique avec ses hôtes. Deux étapes

²⁰ La notion de transmission est appliquée pour la transmission des cellules cancéreuses elle-même. Il ne s'agit pas là d'une transmission de pathogène causant des lésions comme décrit dans la partie précédente.

ENCADRÉ 1 : Mise en évidence de cancers transmissibles par l'étude des relations phylogénétiques entre les hôtes et leur cancer

L'analyse de phylogénie moléculaire, sur un ou plusieurs gènes, permet d'étudier la proximité génétique d'un cancer et de son hôte, et ainsi peut révéler le caractère contagieux de certains cancers. En effet, dans un cas de cancer non transmissible (a), une forte ressemblance entre l'hôte et le cancer est attendue puisque celui-ci a évolué au sein d'un seul hôte duquel il émerge. Sur une phylogénie, cela se traduit par un regroupement des échantillons de cellules saines et de cellules cancéreuses issues du même individu. A l'inverse, dans un cas de cancer transmissible (b), il est d'une part attendu une faible ressemblance entre l'hôte et le cancer, et d'autre part une forte ressemblance génétique entre les cancers issus de différents hôtes. Cet attendu se traduit par un regroupement phylogénétique des échantillons de cellules cancéreuses (rectangle pointillé rouge) et d'une séparation des échantillons de cellules saines et cancéreuses issues d'un même individu.



Représentation schématique des phylogénies moléculaires attendues dans le cas d'un cancer non transmissible (a) et d'un cancer transmissible (b).

essentiels peuvent donc s'ajouter à la cascade métastatique : trouver une route de transmission et échapper au système immunitaire de multiples hôtes (notion de *perfect storm*, Ujvari, Gatenby, & Thomas, 2016). Comme pour tout parasite, un équilibre coévolutif devra également être trouvé pour se maintenir dans la population d'hôtes. Un dernier challenge évolutif sera de réussir à contrecarrer la dégénérescence clonale. Nous verrons que les cancers transmissibles restent des impasses évolutives à long terme.

2.2 Détection

La mise en évidence du caractère transmissible d'un cancer passe par l'étude génétique des tumeurs. Il est question alors d'évaluer la similarité génétique entre les cellules du cancer et de l'hôte, et celle entre tumeurs d'individus différents, et non une recherche de mutation spécifique d'un cancer. Une lignée cancéreuse « classique », bien qu'hétérogène, partage le même génotype de départ que l'organisme qui l'héberge (son seul et unique hôte). *A contrario*, dans un cancer transmissible, les cellules viennent d'un individu différent, on s'attend donc à (i) une forte différence génétique entre cellules saines et cancéreuses (chimérisme) et (ii) une forte similarité génétique entre cellules cancéreuses d'individus différents (puisqu'elles sont issues d'une même lignée, [ENCADRE 1](#)).

2.3 Exploration des cas connus

Au démarrage de cette thèse, huit lignées de cancers transmissibles avaient été mises en évidence: une chez le chien (Canine Transmissible Venereal Tumor, CTVT, Murgia et al., 2006; Rebbeck et al., 2009) ; deux lignées indépendantes chez le diable de Tasmanie (Devil Facial Tumor, DFT1 et DFT2, Pearse & Swift, 2006; Pye et al., 2016) ; et les cinq autres chez des bivalves marins (Bivalve Transmissible Neoplasia²¹, BTN, Metzger et al., 2015; Metzger et al., 2016) dont une chez la mie commune *Mya arenaria*, une chez la palourde *Politates aureus*, deux lignées indépendantes chez la coque *Cerastoderma edule* et une chez la moule *Mytilus trossulus*.

Au départ considérés comme rares, les découvertes conjointes de cancers transmissibles chez les bivalves marins semblent montrer que « lorsqu'on cherche, on trouve », et il est fort probable que leur nombre croisse dans l'avenir. Deux pré-requis sont nécessaires pour mettre en évidence des cancers transmissibles : montrer l'existence d'un cancer (par étude histologique²² par exemple) et effectuer une étude génétique qui révèle son caractère transmissible (comme exposé ci-dessus, voir aussi [ENCADRE 1](#)).

²¹ Ce terme a pour la première fois été introduit par Yonemitsu et al. (2019), nous reviendrons sur cette étude dans le chapitre 2.

²² L'histologie est l'étude microscopique des tissus d'un organisme, cela permet d'en décrire sa structure mais également de voir s'il y a des anomalies et où elles se situent (ex. présence de bactéries, virus, cancer, etc.).

Ainsi, les cas mis en évidence à ce jour se trouvent dans des espèces ayant fait l'objet de suivis réguliers du fait de leur importance économique (bivalves marins), de leur présence dans un programme de conservation (diable de Tasmanie), ou de leur domestication par l'Homme (chien). Notons qu'il existe des cas pour lesquels une transmission clonale entre individus a été cherchée et non trouvée : lions de mer (Leathlobhair, Gulland, & Murchison, 2017), tortue de mer et poisson rouge (Ní Leathlobhair et al., 2021).

Les lignées les plus étudiées à ce jour sont le CTVT chez le chien et les DFT1 et 2 chez le diable de Tasmanie. En effet, plusieurs paramètres qui permettent de caractériser la dynamique hôte-cancer sont à ce jour connus comme la prévalence, la distribution des populations hôtes touchées, la pathogénicité (ou virulence), la voie de transmission ou encore les mécanismes de défenses des hôtes et les contournements de ces mécanismes par le cancer. Pour les BTN des bivalves, leur mise en évidence récente explique les connaissances limitées concernant leur dynamique évolutive et leur coévolution avec les populations hôtes. Cependant, les différentes lignées de cancers transmissibles semblent varier dans leur histoire évolutive, leur dynamique, leur prévalence, leur distribution et leurs interactions avec les populations d'hôtes. Bien que nous allons passer en revue les différents cas, une attention particulière sera accordée aux moules qui sont le sujet d'étude de cette thèse.

2.3.1 Canine Transmissible Venereal Tumor chez le chien

Le CTVT du chien est un cancer qui se manifeste sous forme de tumeurs solides au niveau des voies génitales et qui se transmet lors de l'accouplement. C'est une lignée ancienne (entre 4000 et 8000 ans) qui serait issue d'une cellule dendritique ou macrophage (Marchal et al., 1997; Mozos et al., 2016) d'un hôte fondateur appartenant à une population probablement située en Asie (Baez-Ortega et al., 2019; Leathlobhair et al., 2018). Si l'étude des gènes nucléaires indique une émergence unique (Baez-Ortega et al., 2019), l'étude des gènes mitochondriaux indique de nombreux événements de capture mitochondriale (de l'hôte vers le cancer) tout au long de son histoire évolutive (Strakova et al., 2016, 2020). La répartition actuelle de ce cancer est mondiale (presque tous les continents, plus de 90 pays) et sa prévalence est estimée autour de 5% (Strakova & Murchison, 2014).

Le CTVT n'est généralement pas fatal et le temps d'incubation²³ est autour de deux mois dans les populations sauvages de chiens. Après la transmission commence la phase de progression durant

²³ Le temps d'incubation correspond au temps entre le moment de l'infection et l'apparition des premiers symptômes (temps nécessaire pour que la maladie se déclare).

laquelle les cellules du CTVT n'expriment quasiment pas les CMH²⁴ de type I et II, ce qui leur permet d'échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T²⁵ de l'hôte qui ne pénètrent pas la tumeur (Hsiao et al., 2008). Après trois à neuf mois, la progression se stabilise pour une durée allant de quelques mois à des années, et se termine souvent par une régression de la tumeur. Cette régression est caractérisée par une augmentation de l'expression des CMH dans les cellules cancéreuses induisant ainsi une reconnaissance par les lymphocytes T qui pénètrent alors la tumeur et participent à sa résorption. Cette progression indique que l'absence de CMH est liée à des mécanismes de régulation (augmentation de l'expression par la voie IFN- γ ²⁶) et non à des mutations entraînant une perte de fonction. Le CTVT assure ainsi sa transmission sans pour autant éliminer son hôte (Siddle & Kaufman, 2013), ce qui résulte certainement de la longue coévolution hôte-cancer (phénomène également observé chez les parasites).

2.3.2 *Devil Facial Tumors 1 et 2 du diable de Tasmanie*

A l'opposé du CTVT, les deux lignées de DFT ont émergé très récemment et comme l'aire de répartition de leur hôte est restreinte à l'île de Tasmanie, il en est de même pour la lignée la plus ancienne, alors que la lignée la plus récente est pour l'instant circonscrite à une sous-partie de l'île seulement. Les deux lignées se manifestent par des tumeurs faciales et se transmettent lors de combats par morsure pour l'accès à la nourriture ou à la reproduction. Observé pour la première fois en 1996 et ayant émergé une dizaine d'année plus tôt (Patton et al., 2020), le DFT1 aurait émergé à partir d'une cellule de Schwann chez un individu femelle (Murchison et al., 2010) du nord-est de l'île. Il s'est ensuite diversifié en cinq sous-lignées dont trois ont dispersé sur le reste de l'île et deux se sont éteintes (Kwon et al., 2020). Cette lignée, quasiment toujours fatale, est responsable d'un déclin de 90% de la population des diables de Tasmanie au cours des vingt dernières années et les menace d'extinction (Brüniche-Olsen et al., 2014; Hawkins et al., 2006; McCallum et al., 2007). Le DFT2 a été observé pour la première fois en 2014 dans le sud-ouest de l'île et aurait émergé peu de temps avant. L'origine tissulaire de DFT2 pourrait être la même que DFT1 (Stammnitz et al., 2018) et l'hôte fondateur un mâle, comme le prouve la présence d'un chromosome Y (Kwon et al., 2018; Pye et al., 2016).

Les DFTs échappent activement au système immunitaire des hôtes. Comme pour le CTVT, les cellules du DFT1 ne présentent pas de CMH à leur surface. Cette absence résulte également d'une

²⁴ Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I et II. C'est un groupe de molécule qui sert à la reconnaissance du soi. Il est spécifique des vertébrés.

²⁵ Cellules de l'immunité qui élimine les cellules étrangères si les antigènes des CMH sont reconnus comme du « non-soi ».

²⁶ L'interféron gamma est une cytokine soluble sécrété par différentes cellules de l'immunité et qui joue notamment un rôle dans l'induction de l'expression des CMH de classe II.

régulation négative (Siddle & Kaufman, 2013) qui empêche la reconnaissance par les lymphocytes T de l'hôte. Contrairement au CTVT, l'expression des CMH n'est pas secondairement rétablie avant la mort de l'hôte. L'hôte ne meurt pas directement de son cancer mais de faim, lorsque la tumeur devenue trop grosse l'empêche de s'alimenter. De manière intéressante, le DFT2 a majoritairement été retrouvé infectant des mâles, le même sexe que son hôte fondateur. Les auteurs stipulent qu'il serait alors possible que la présence du chromosome Y soit favorable à la reconnaissance du cancer par les cellules immunitaire des hôtes femelles et défavorise leur contamination par le DFT2 (Stammnitz et al., 2018).

2.3.3 Autres cas chez les vertébrés

Entre 1940 et 1970, des cas de transmissions de cancers en population de laboratoire ont été documentés chez le hamster doré (*Mesocricetus auratus*). En effet, de multiples transmissions avait eu lieu suite à l'inoculation expérimentale de tumeurs (greffe, injection de tumeur broyée) mais également lors de contact entre individus cancéreux et sains - via du cannibalisme (Brindley & Banfield, 1961) ou des piqûres de moustiques (Banfield, Woke, Mackay, & Cooper, 1965). L'hypothèse d'une cause virale a dès le départ été écartée du fait de l'absence de particule virale lors d'observations microscopiques des tumeurs et de l'échec de transmission par filtrat de tumeur broyée (Ashbel, 1945; Cooper et al., 1964). De plus, les caryotypes des cellules cancéreuses étaient très similaires entre eux (et différents de l'hôte) et stable au cours de plus de 80 passages entre individus (Cooper et al., 1964). L'évolution en cancer métastatique a systématiquement été observée, y compris lors des 288 transferts d'une même tumeur sur 11 ans (Fabrizio, 1965).

Il existe également des cas de transmission de cancer chez l'Homme mais ils sont rares et résultent d'un seul passage entre deux individus. La seule voie de transmission naturelle connue est le passage de cellules cancéreuses de la mère à l'enfant²⁷ lors de la gestation (transplacentaire, Tolar & Neglia, 2003) ou lors de l'accouchement par voie basse (aspiration dans les poumons, Arakawa et al., 2021). Au total, 20 cas ont été reportés impliquant des transferts de leucémies, lymphomes, mélanomes et carcinomes (col de l'utérus et poumon) pouvant se disséminer dans différents tissus et organes de l'enfant (foie, poumon, cerveau, os, entre autre). L'issue de cette transmission n'est pas toujours fatale et des cas de régressions spontanées ont été observés (Tolar & Neglia, 2003; Valenzano et al., 2010). Une

²⁷ L'origine maternelle des cellules cancéreuses est mise en évidence par caryotypage ou *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) des chromosomes sexuels (absence de Y dans les cellules cancéreuses d'un enfant mâle), typage de marqueurs microsatellites, *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) sur des gènes cibles et, plus récemment, analyses *Next-generation sequencing* (NGS).

étude a également montré une perte d'allèles de CMH (ceux non hérités par l'enfant²⁸) dans les cellules cancéreuses issues de la mère, suggérant un mécanisme possible d'échappement immunitaire (Isoda et al., 2009). Les autres cas de transmissions connus impliquent tous une intervention médicale et/ou une immunodéficiency de l'individu receveur. En effet, quelques cas de greffes d'organes ont résulté d'un transfert de cancer du donneur au receveur²⁹ (Abdullayeva, 2020). En plus d'offrir une voie de transmission, la greffe est accompagnée d'un traitement immunosuppresseur pour éviter les rejets, ce qui peut favoriser l'établissement de la tumeur dans l'individu receveur. Certains cas impliquent même le transfert de cancer d'un donneur dans plusieurs individus receveurs ayant reçu différents organes (Atreya et al., 2020; Stephens et al., 2000). Des cas accidentels de transmission par piqûre avec l'aiguille de biopsie (n'impliquant pas d'immunodéficiency) ont également été reportés (Gärtner et al., 1996; Gugel & Sanders, 1986). Enfin, un cas unique de transmission interspécifique d'un ténia (*Hymenolepis nana*) vers son hôte humain a été observé chez un individu infecté par le VIH (*human immunodeficiency virus*) qui présentait des tumeurs au niveau des poumons et des ganglions lymphatiques (Muehlenbachs et al., 2015). Bien qu'ils existent, les cas de transmissions de cancers chez l'Homme restent rares et témoignent de l'efficacité des différentes barrières dont celle du système immunitaire. C'est ce dont témoignent également des expériences de transmission de tumeurs à des centaines de « volontaires » conduites en 1957 qui ont toutes échouées (sauf pour un cas, Southam, Moore, & Rhoads, 1957).

2.3.4 Bivalve Transmissible Neoplasia (BTN)

L'étude des processus néoplasiques³⁰ chez les bivalves n'est pas nouvelle. Les études menées avant la mise en évidence des cancers transmissibles semblent donc indispensables pour la compréhension des BTN. Cela est d'autant plus vrai qu'on connaît peu de choses sur ces systèmes hôte-cancer dont la prévalence, la répartition des populations touchées, la virulence, la transmission, les défenses des hôtes et le détournement de celles-ci par le cancer représentent des indicateurs importants sur leurs dynamiques. Pour cette raison, un aperçu général des recherches menées sur la néoplasie disséminée (DN) chez les bivalves sera présenté ici avant de décrire les différentes lignées de BTN.

²⁸ Qui serait reconnu comme du non-soi par le système immunitaire de l'enfant et éliminés.

²⁹ L'origine des cellules cancéreuses est généralement prouvée par typage de CMH (HLA), empreinte génétique ciblé par PCR, analyse chromosomique par FISH ou par immunohistochimie.

³⁰ Deux types de cancers ont été décrits chez les bivalves marins : le néoplasie disséminée (décrite ici) et la néoplasie gonadique (dont le caractère transmissible n'a pas été démontré et qui ne sera pas évoqué ici).

2.3.4.1 La néoplasie disséminée (DN) chez les bivalves: description, prévalence et étiologie

La néoplasie disséminée (DN) a été décrite pour la première fois à la fin des années 1970 chez les huîtres (*Crassostrea virginica* et *C. gigas*, Farley, 1969), puis successivement dans plus d'une vingtaine d'espèces de bivalves marins³¹ à travers le monde (Barber, 2004; Carballal, Barber, Iglesias, & Villalba, 2015; Peters, 1988). La DN n'est pas directement visible sur les animaux atteints et nécessite une observation approfondie des tissus par étude histologique, cytologique ou de cytométrie en flux. Depuis sa mise en évidence, différents critères morphologiques, fonctionnels et génétiques ont permis de définir la DN comme un processus néoplasique. En effet, cette pathologie se caractérise par la présence de cellules anaplastiques³² de diamètre important, arrondies ou ovales, avec un large noyau pléomorphe, un rapport noyau:cytoplasme élevé, une perte d'adhérence³³ et une faible diversité d'organelles³⁴ souvent anormales (Carballal et al., 2013; Díaz et al., 2011; Elston et al., 1992; Mix et al., 1979; Smolarz et al., 2005). De plus, ces cellules présentent des anomalies génétiques qui se traduisent par une aneuploïdie et un nombre de chromosomes généralement supérieur à celui des cellules normales³⁵ (Díaz et al., 2013; Le Grand et al., 2010; Lowe et Moore, 1978; Moore et al., 1991; Reno et al., 1994; Vassilenko et Baldwin, 2014). Enfin, ces cellules sont retrouvées dans le système circulatoire (vaisseaux et branchies) et peuvent infiltrer le tissu conjonctif de différents organes (muscle, manteau, glande digestive, entre autre) où elles prolifèrent anormalement³⁶ et conduisent généralement à la mort de l'animal après quelques mois. Au départ peu nombreuses et localisées dans un organe (stade précoce) puis dans plusieurs (stades intermédiaires), les cellules néoplasiques vont totalement envahir les différents tissus de l'animal (stade avancé). Bien que ces néoplasies soient majoritairement fatales, des cas de rémissions ont été reportés (Brousseau et Baglivo, 1991; Burioli et al., 2019; Cooper et al., 1982; Elston et al., 1988). Les cellules de la DN ont souvent été comparées à des hémocytes³⁷ par association de caractéristiques morphologiques et de leur présence dans le système circulatoire

³¹ Les huîtres *Crassostrea*, *Saccostrea* et *Ostrea*, les palourdes *Venerupis*, les moules *Mytilus*, *Macoma*, les coques *Cerastoderma*, les myes *Mya*, les praires *Venus*, entre autre.

³² Des cellules différenciées qui ont une perte de fonction anormale secondaire mais ne reviennent pas à l'état de cellules souche (au sens large).

³³ Cette perte d'adhérence pourrait être reliée à une déstructuration du cytosquelette des cellules cancéreuses (Moore et al. 1992)

³⁴ Les organelles sont des structures différenciées et délimitées d'une membrane, et interne aux cellules.

³⁵ Les bivalves marins sont des organismes diploïdes qui contiennent deux copies homologues de chaque chromosome.

³⁶ Observation fréquente de figure mitotique, en nombre bien supérieur que dans un individu sain.

³⁷ La DN est également appelé néoplasie hémocytaire du fait de ces analogies. Les hémocytes sont les cellules du système circulatoire des invertébrés. Nous reviendrons sur leur rôle chez les moules dans la section 3.4.1.

(l'hémolymphe³⁸). La DN a ainsi souvent été comparée à une leucémie (*leukemia-like disease*). Le manque de connaissance sur l'hématopoïèse des bivalves ne permet pas de conclure sur l'origine tissulaire des hémocytes et donc des cellules cancéreuses. Plusieurs hypothèses de tissu d'origine des hémocytes ont été proposées dont : la gonade³⁹ (Farley, 1969a; Rasmussen, 1986) et le tissu conjonctif (Carballal et al., 2013; Jemaà et al., 2014; Mix, 1975; Noel et al., 1991; Reinisch et al., 1983); mais sont actuellement toujours débattues (pour une revue voir Pila et al., 2016).

Dans plusieurs espèces de bivalves⁴⁰, la DN a été associée à des épisodes de forte mortalité (Alderman et al., 1977; Christensen et al., 1974; da Silva et al., 2005 et 2011; Dairain et al., 2020; Elston et al., 1992; Green et al., 2008; Ordás et Figueras, 2005; Villalba et al., 2001) avec des prévalences élevées (20-40%) pouvant atteindre quelque fois 90% (Farley et al., 1991; McGladdery et al., 2001; Reinisch et al., 1984). Des variations saisonnières de la prévalence ont également été reportées et les *pattern* varient selon l'espèce et la population étudiée (Carballal et al., 2015). Étant donné la variabilité de prévalence, d'incidence, de temporalité et de localisation géographique des espèces touchées par la DN, plusieurs étiologies ont été proposées: (i) agents contaminants présents dans l'environnement ou (ii) agent infectieux (viral). En effet, les sites pollués par le rejet des eaux usées, la présence de pesticides ou d'autres contaminants (hydrocarbure, métaux lourds, etc.) ont une prévalence et une incidence de DN plus élevées que les sites non pollués (Arriagada et al., 2014; Barber, 2004; Böttger et al., 2013; Krishnakumar et al., 1999; Landsberg, 1996; Muttaray et al., 2012; Pariseau et al., 2009; St Jean et al., 2005). D'un autre côté, l'origine virale a été proposée suite à des transmissions de DN par co-habitation, injection d'hémolymphe totale et filtrée⁴¹ (Collins et Mulcahy, 2003; Elston et al., 1988b; Kent et al., 1991; McGladdery et al., 2001; Weinberg et al., 1997) et l'observation de retrovirus (directe), de particule de type rétrotransposon, et/ou d'une forte activité de reverse transcriptase dans des individus néoplasiques (Oprandy et Chang, 1983; Oprandy et al., 1981; Romalde et al., 2007). Par la suite, l'absence de retrovirus (supposé exogène) malgré une forte activité de reverse transcriptase, a amené certains auteurs à proposer l'existence d'un retrovirus endogène ou d'un retrotransposon⁴² (AboElkhair et al., 2012, 2009; Siah et al., 2011). L'association entre la DN et une forte activité d'un retrotransposon,

³⁸ L'Hémolymphe est le liquide du système circulatoire des invertébrés qui est équivalent au système sanguin et lymphatique des vertébrés.

³⁹ La gonade est l'organe où sont produits les gamètes (mâle ou femelle) d'un animal.

⁴⁰ *Saccostrea glomerata*, *Ostrea edule*, *Mytilus trossulus*, *Mya arenaria*, *Mya marginatus* et *Cerastoderma edule*

⁴¹ Filtré à 0.22µm, ce qui ne laisse pas passer les bactéries mais ce qui est plus petit comme les virus.

⁴² Ce sont des éléments mobiles d'origine virale, qui peuvent s'insérer aléatoirement dans le génome et ainsi altérer la fonction des gènes. C'est une des sources de mutations somatiques qui peuvent conduire à un développement cancéreux.

Steamer, retrouvée chez *Mya arenaria*⁴³ (Arriagada et al., 2014) a relancé l'hypothèse d'agent viral. Cela a finalement amené Metzger et al. (2015) à identifier chez *Mya arenaria* l'existence d'une lignée cancéreuse capable de se transmettre d'individus en individus. La découverte du même processus de transmission dans les DN de 3 autres espèces (Metzger et al., 2016) suggère qu'une des causes principale de la DN pourrait être la transmission clonale de lignées cancéreuses indépendantes. Les autres causes proposées pourraient cependant influencer conjointement la prévalence et l'incidence de la maladie (notamment la pollution des milieux).

2.3.4.2 De la DN au BTN chez les moules *Mytilus*

Prévalence et incidence de la DN. Chez la moule, le premier cas de néoplasie disséminée (DN) a été décrit⁴⁴ par Farley (1969b) dans 10/100 individus issus d'une population de *Mytilus trossulus* (mentionnée comme *M. edulis*) de la baie de Yaquina dans l'Oregon (États-Unis). Par la suite, la DN a été reliée à des épisodes de mortalités dans des populations de *M. trossulus* aux États-Unis (Washington et Oregon, Mix et al., 1979) et au Canada (Colombie Britannique, Elston et al., 1992). Les prévalences élevées (autour de 20%) chez *M. trossulus* d'Amérique du Nord, n'ont cependant pas été retrouvées dans les populations du Nord de l'Europe (Danemark, Finlande, Mer Baltique, moins de 1%, Rasmussen, 1986; Sunila, 1987; Usheva et Frolova, 2000). Des cas de DN ont également été décrits, avec des prévalences généralement faibles et ne causant pas de mortalités significatives, dans trois autres espèces du genre⁴⁵ : *M. edulis* (~1%; Angleterre, M. Green & Alderman, 1983; Lowe & Moore, 1978; France, Burioli et al., 2019; États-Unis, Figueras, Jardon, & Caldas, 1991; Galimany & Sunila, 2008; Hillman et al., 1992), *M. galloprovincialis* (<1%, Espagne, Carrasco et al., 2008; Figueras et al., 1991b; Fuentes et al., 2002; Villalba et al., 1997; Italie, Carella et al., 2013; Matozzo et al., 2018; Zizzo et al., 1991; Slovénie, Gombač et al., 2013; Roumanie, Ciocan & Sunila, 2005 ; États-Unis, Elston et al., 1992) et *M. chilensis* (2-10%, Chili, Campalans et al., 1998; Cremonte et al., 2015; Lohrmann et al., 2019; 13% Argentine, Cremonte, Vázquez, & Silva, 2011). Une variation saisonnière de prévalence a été décrite chez *Mytilus trossulus* avec une prévalence plus élevée durant l'hiver suivie d'une baisse durant l'été et le début de l'automne (Mix, 1983; Rasmussen, 1986).

Histopathologie de la DN. Différents types cellulaires de DN ont été décrit sur des critères morphologiques et de contenu en ADN. Lowe et Moore (1978) ont proposé l'existence de deux types cellulaires chez *M. edulis* représentant des morphologies extrêmes d'une même lignée cellulaire: type

⁴³ 150 à 300 copies pour DN contre 2 à 10 copies endogènes pour un individu sain.

⁴⁴ Par observation histologique.

⁴⁵ Voir section de l'introduction 3.1 pour une description plus approfondi des espèces du genre *Mytilus*

A⁴⁶ - chromatine condensé, noyau très élargi, un seule nucléole et un contenu en ADN de 6.8-7.7 x diploïde (14n) -, et type B⁴⁷ - chromatine diffuse, noyau large, et un contenu en ADN de 3.8-4.3 x diploïde (8n). L'existence d'une seule lignée cellulaire avec deux morphotypes distincts a également été soutenue par Mix et al. (1979) chez *M. trossulus* et Green et Alderman (1983) chez *M. edulis*. Par la suite, Moore et al. (1991) ont décrit *M. trossulus* deux types cellulaires - coexistant dans les mêmes populations mais rarement retrouvés dans une même moule (5%) - qu'ils considèrent alors comme appartenant à deux pathologies distinctes. En effet, l'étude de la ploïdie par cytométrie en flux révéla une première population cellulaire composée majoritairement de cellules tétraploïdes (4n) et quelques octoploïdes (8n, correspondant à la mitose), et une seconde avec une majorité de cellules pentaploïdes (5n) et une fraction de décaploïdes (10n, également la mitose). Bien que les auteurs supposent que la distinction des deux types cellulaires en cytologie ne soit pas évidente, plusieurs critères morphologiques les différencient : large noyau, petit cytoplasme et un nucléole pour les cellules « pentaploïdes », et des cellules légèrement plus petites composées de deux nucléoles pour les « tétraploïdes ». Plus tard, Carella et al. (2013) ont décrit 5 morphotypes de DN chez *M. galloprovincialis* dont deux majoritaires correspondant aux types A et B précédemment décrits et les trois autres à des sous-types de A et B. Les stades précoces étaient caractérisés par une majorité de type A, les stades intermédiaire par un mélange de types A-B et les stades avancés par une majorité de type B. Les auteurs ont alors proposé l'hypothèse d'une seule lignée cellulaire évoluant en différents morphotypes. Ces morphotypes seront également observés en histologie chez *M. edulis* par Burioli et al. (2019) qui décrivent une hétérogénéité des cellules de DN dans les tissus. Cependant, les observations cytologiques de cette même étude révèlent 4 types cellulaires (homogène pour un individu) et peu de figures mitotiques de DN dans le système circulant des moules affectées. Enfin, aucun morphotype ne semble relié à un stade d'avancement particulier de la maladie.

L'état de progression pathologique de la néoplasie disséminée a souvent été caractérisé en histologie par la quantité de cellules néoplasique et l'état d'envahissement des tissus. Trois stades sont décrits : (i) le stade précoce, auquel des cellules cancéreuses isolées sont retrouvées dans les vaisseaux ou infiltrées dans le tissu conjonctif d'un seul organe (souvent observées autour de la glande digestive et de l'estomac), (ii) le stade intermédiaire, auquel le nombre de cellules de DN est augmenté et ces dernières se retrouvent par « paquets » dans plusieurs organes, (iii) le stade avancé, auquel une perte de l'intégrité des tissus conjonctifs et des vaisseaux dilatés sont observés, qui sont une conséquence du

⁴⁶ Nommé « B » dans l'article original mais aujourd'hui utilisé sous le terme indiqué ici

⁴⁷ Nommé « A » dans l'article original mais aujourd'hui utilisé sous le terme indiqué ici.

remplacement total des tissus par les cellules de DN (amenant à la mort de l'animal). Lorsque le diagnostic est réalisé par étude cytologique de l'hémolymphe, les trois stades décrits en histologie correspondent à des pourcentages croissants de cellules cancéreuses circulantes : (i) 1-15%, (ii) 15-75%, (iii) 75-100% de cellules de néoplasiques. Les causes exactes de l'issue fatale de la DN ne sont pas clairement connues mais le remplacement total des tissus doit profondément altérer la condition physiologique globale de l'animal atteint. Une étude a observé des atrophies gonadiques d'individus *M. chilensis* fortement atteints par une DN (Cremonte et al., 2011), ce qui indiquerait qu'en plus d'impacter la survie, la maladie pourrait également impacter la reproduction des animaux atteints.

Mécanismes moléculaires de la DN. Les quelques études qui se sont penchées sur les bases génétiques⁴⁸ de la DN, se sont majoritairement focalisées sur deux familles de gènes connues pour être impliquées dans de nombreux cancers humains : *p53* et *RAS*. Par homologie de séquences, les domaines structuraux de ces familles de gènes sont retrouvés hautement conservés entre les vertébrés et les moules *Mytilus*, ce qui suggère que leurs rôles fonctionnels pourraient l'être également (Ciocan & Rotchell, 2005; Ciocan et al., 2006; Muttray et al., 2007). L'expression de ces gènes a été retrouvée modifiée chez des individus *M. trossulus* affectés par la DN : *p53* et l'isoforme $\Delta Np63/73$ ⁴⁹ (Muttray, Schulte, & Baldwin, 2008), ainsi que le gène *ras* (Ciocan et al., 2006) sont surexprimés⁵⁰ par rapport aux individus sains. Notons cependant que ces résultats ont été interprétés avant de savoir que la DN pouvait être un cancer transmissible.

De la DN au BTN. En 2016, Metzger et al. (2016) ont mis en évidence la transmission clonale de la DN dans une population *M. trossulus* de Colombie Britannique (Pacifique). Pour ce faire, ils ont séquencé un gène nucléaire (*Elongation Factor*, EF1 α) et un gène mitochondrial (*cytochrome c oxidase I*, mtCOI) à partir d'hémolymphe et d'un échantillon de tissu solide d'individus sains et néoplasiques (diagnostiqués préalablement par histologie). Pour les deux marqueurs, les génotypes des échantillons de tissu solide et d'hémolymphe des individus sains sont apparus identiques, tandis que ceux des individus néoplasiques étaient différents. De plus, les génotypes des cellules cancéreuses (venant d'individus différents) étaient identiques indiquant qu'elles appartenaient à une seule et même lignée d'origine *M. trossulus*. Par la suite, Riquet et al. (2017) ont détecté la présence d'allèles *M. trossulus* à plusieurs locus diagnostiques⁵¹

⁴⁸ Les bases génétiques qui témoignent d'une altération de fonction d'un ou plusieurs gènes connus pour être impliqués dans la cancérogénèse : proto-oncogène ou gène suppresseurs de tumeurs.

⁴⁹ Ce nom a été donné du fait de la similarité avec l'isoforme $\Delta Np73$ des mammifères

⁵⁰ Le taux d'expression a été obtenu par amplification RT-PCR d'ARN extrait d'hémolymphe.

⁵¹ Locus pour lequel l'état allélique est connu pour être spécifique du cancer.

chez quelques individus *M. edulis* de populations Françaises (0.5%) dans lesquelles *M. trossulus* n'est pas présente. La présence de génotypes « hybrides » en absence d'un des deux parents étant très surprenante, ces auteurs ont soulevé l'hypothèse que le cancer transmissible *M. trossulus* pouvait être présent en France. La détection de deux mitochondries, une *M. edulis* et une *M. trossulus*, dans certains de leurs échantillons a permis de renforcer cette hypothèse. Si tel était le cas, le cancer aurait réussi à franchir la barrière des espèces (comme observé dans d'autres BTN) et à infecter les populations *M. edulis* de France. Cette hypothèse est également soutenue par la réussite de transferts de cellules de DN de *M. trossulus* (Puget Sound, Washington) dans des *M. trossulus* de la même population (Kent et al., 1991) et dans des *M. edulis* de France (Noel, 1992).

2.3.4.3 BTN chez les autres bivalves

La première lignée de cancer transmissible chez les bivalves a été mise en évidence dans trois populations de *Mya arenaria* de la côte Est de l'Amérique du Nord (Metzger et al., 2015). La transmission clonale avait été suggérée suite à la découverte de génotypes similaires entre cellules cancéreuses mais discordants des cellules saines des différents hôtes. Ces différences avaient été obtenues par l'analyse des sites d'intégration du retrotransposon *Steamer*, de séquences de deux marqueurs mitochondriaux (*COI* et cytochrome b, *CYTB*) et de 10 locus microsatellites nucléaires polymorphes. La majorité des sites d'intégration de *Steamer* sont communs aux BTN des trois populations ce qui indique qu'ils seraient survenus tôt dans l'histoire évolutive de cette lignée cancéreuses et que certains auraient pu contribuer à la transformation cellulaire dans l'hôte fondateur.

Par la suite, les mêmes comparaisons génétiques ont mis en évidence la transmission clonale de la DN dans deux autres espèces : *Cerastoderma edule*⁵² et *P. aureus*⁵³ (Metzger et al., 2016). Chez les coques, ces comparaisons ont révélé deux clusters cancéreux génétiquement distincts indiquant l'existence de deux lignées indépendantes. De plus, les observations histologiques des individus néoplasiques ont montré que chaque lignée correspondait à un type cellulaire de DN (précédemment décrit par Carballal et al., 2001) : lignée 1 aux cellules de type A et lignée 2 aux cellules de type B. Ces observations correspondent donc au premier cas d'émergences multiples de cancer transmissible chez des bivalves (comparable aux deux émergences du DFT). Autre fait intéressant, les génotypes de la lignée cancéreuse chez *P. aureus* indiquent d'une part une transmission clonale et d'autre part que la lignée a émergé dans un individu d'une espèce voisine *Venerupis corrugata* (espèce phylogénétiquement proche

⁵² Microsatellites, marqueurs mtCOI et EF1, chez 6 individus cancéreux

⁵³ Marqueur mtCOI, EF1 et *ribosomal DNA internal transcribed spacer*, rDNA ITS, chez 6 individus cancéreux

et présente sur le site échantillonné). D'autant plus surprenant, malgré l'analyse de centaine d'individus, aucun cas de DN n'a été retrouvé dans cette espèce (*V. corrugata*). Ces observations indiquent donc que les cancers transmissibles peuvent parfois dépasser la barrière d'espèce, voir effectuer un saut d'hôte complet.

La découverte des cancers transmissibles chez les bivalves a donc permis de remettre en question leur rareté, d'ajouter un exemple d'émergences multiples et montre également la possibilité de transmission inter-espèces et inter-genres.

3. Modèle d'étude : moules du genre *Mytilus* sp. et leur cancer transmissible

3.1 Le complexe d'espèce *Mytilus edulis* et son écologie

Le complexe d'espèces *Mytilus edulis* est composé de six espèces réparties sur les deux hémisphères suivant une distribution anti-tropicale (FIGURE 5). Trois espèces sont retrouvées dans l'hémisphère Nord : *M. edulis*, *M. trossulus* et *M. galloprovincialis* ; et les trois autres dans l'hémisphère Sud : *M. plantensis*, *M. chilensis* et *M. planulatus*. L'isolement reproductif entre ces espèces est incomplet et elles peuvent s'hybrider lorsqu'elles se rencontrent naturellement (contact secondaire) ou *via* l'introduction humaine (Fraïsse et al., 2016; Popovic et al., 2020; Simon et al., 2020). L'histoire évolutive de ces espèces est faite de successions d'isolements et de contacts secondaires qui ont façonné leur diversité actuelle (Fraïsse, 2014; Fraïsse et al., 2018).

Dans cette thèse, on s'intéressera plus spécifiquement au trio d'espèces de l'hémisphère Nord (*M. edulis*, *M. trossulus* et *M. galloprovincialis*). Résultat d'une histoire évolutive complexe, de nombreuses sous-lignées ont été décrites au sein de chaque espèce (FIGURE 5). Les espèces *M. edulis* et *M. trossulus* se distribuent naturellement entre l'Europe et l'Amérique du Nord, tandis que *M. galloprovincialis* est retrouvée en Europe sur les côtes atlantique et méditerranéenne. La population *M. trossulus* d'Europe, qui se trouve en mer Baltique, a la particularité d'être fortement introgressée par *M. edulis*, à tel point que la mitochondrie femelle *M. edulis* a totalement remplacé celle de *M. trossulus* (Quesada et al., 1995). Pour l'espèce *M. edulis*, deux lignées européennes se distinguent : celle du sud, incluant les populations d'Atlantique, de la Manche et des côtes anglaises de la mer du Nord ; et celle du nord, incluant les populations Norvégiennes de la mer du Nord et les côtes russe de la mer de Barents et la mer Blanche (Simon et al., 2021). Deux lignées de *M. galloprovincialis* ont aussi été identifiées avec une lignée atlantique et une lignée méditerranéenne qui s'hybrident à l'ouest de la Méditerranée le long des

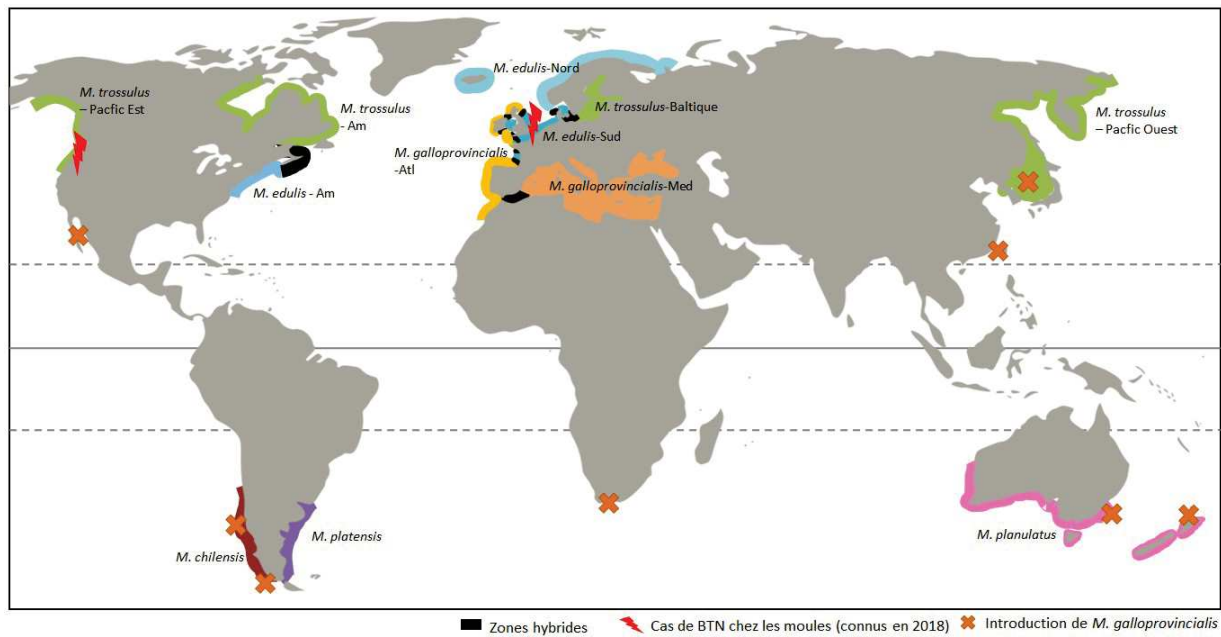


FIGURE 5 : Distribution mondiale des différentes espèces et sous-lignées du complexe d'espèces *Mytilus edulis*. Les aires de répartition de *M. edulis* sont indiquées en bleu, celles de *M. galloprovincialis* en orange, celles de *M. trossulus* en vert, celles de *M. chilensis* en rouge foncé, celles de *M. platensis* en violet et celles de *M. planulatus* en rose. Les différentes sous-lignées sont indiquées à côté du nom d'espèce avec Am pour Américaine, Atl pour Atlantique et Med pour Méditerranée. Les zones hybrides sont représentées en noir. Les croix orange désignent des zones où *M. galloprovincialis* a été introduite. Les éclairs rouges désignent la population *M. trossulus* de Colombie Britannique dans laquelle un cancer transmissible a été décrit par Metzger et al. (2016) et les populations *M. edulis* pour laquelle la présence de ce cancer a été suspectée par Riquet et al. 2017 (inspiré de Simon 2019).

côtes algériennes (El Ayari et al., 2019). Cette espèce, abondamment utilisée par la mytiliculture⁵⁴, a été introduite à de nombreux endroits (Canada côté Pacifique, Chili, Afrique du Sud (dépourvu de moules *Mytilus*), Chine, Corée, Australie, Nouvelle Zélande) où elle peut s'hybrider avec les espèces indigènes (Popovic et al., 2020). Récemment, une lignée admixée a été mise en évidence dans plusieurs ports commerciaux français (côte atlantique et Manche, Simon et al., 2020) : les « dock mussels » présentant un génome admixé entre la lignée *M. galloprovincialis* Méditerranéenne et la lignée locale *M. edulis*.

La distribution géographique mondiale des moules *Mytilus* spp. témoigne d'une grande variabilité de niches exploitées. Ce sont des espèces qui localement dominent les zones intertidales, subtidales et estuariennes et qui se fixent sur divers substrats naturels (rochers) et artificiels (pontons, bouées, coques de bateau, etc.). Elles sont grégaires et ont tendance à s'agglomérer les unes aux autres ce qui leur confère une protection contre les forts courants, les vagues (Zardi et al., 2021) et les prédateurs (Côté & Jelnikar, 1999; Khalaman & Lezin, 2015; Reimer & Tedengren, 2009). La densité de population peut varier et définit une organisation en bancs, en grappes ou solitaire. Elles tolèrent également de larges gammes de températures (y compris des températures temporairement extrêmes en plein soleil à marée basse), de salinité et d'exposition aux vagues. En effet, les températures maximales sont autour de 30°C et les minimales de l'ordre du négatif pour *M. edulis* et *M. trossulus* et autour de 7°C pour *M. galloprovincialis*. De plus, *M. galloprovincialis* est retrouvée dans des zones de salinité plus élevée que les deux autres espèces. Dans les zones où les espèces vivent en sympatrie, ces facteurs écologiques peuvent influencer leur distribution. C'est par exemple le cas de la zone hybride « *edulis-galloprovincialis* » de Bretagne Sud où les génotypes *M. galloprovincialis* sont retrouvés dans des habitats à salinité océanique et battus par les vagues tandis que les génotypes *M. edulis* sont majoritaires dans des eaux influencées par les estuaires et abritées des vagues (Bierne et al., 2003).

3.2 Morphologie, anatomie et physiologie

Les moules possèdent une coquille bivalve qui a un rôle d'exosquelette et protège leur corps mou (FIGURE 6). Les deux valves sont de morphologie identique et se connectent au niveau du ligament de la charnière. L'ouverture et fermeture de la coquille se fait par contraction des muscles adducteurs (antérieur et postérieur) et dépend des variations extérieures (fermeture en cas d'exondation ou de

⁵⁴ La mytiliculture correspond à l'élevage de moules. En France, l'espèce *M. edulis* est majoritairement cultivée sur les côtes Atlantiques et de la Manche tandis qu'en Méditerranée on cultive *M. galloprovincialis* (lignée méditerranéenne).

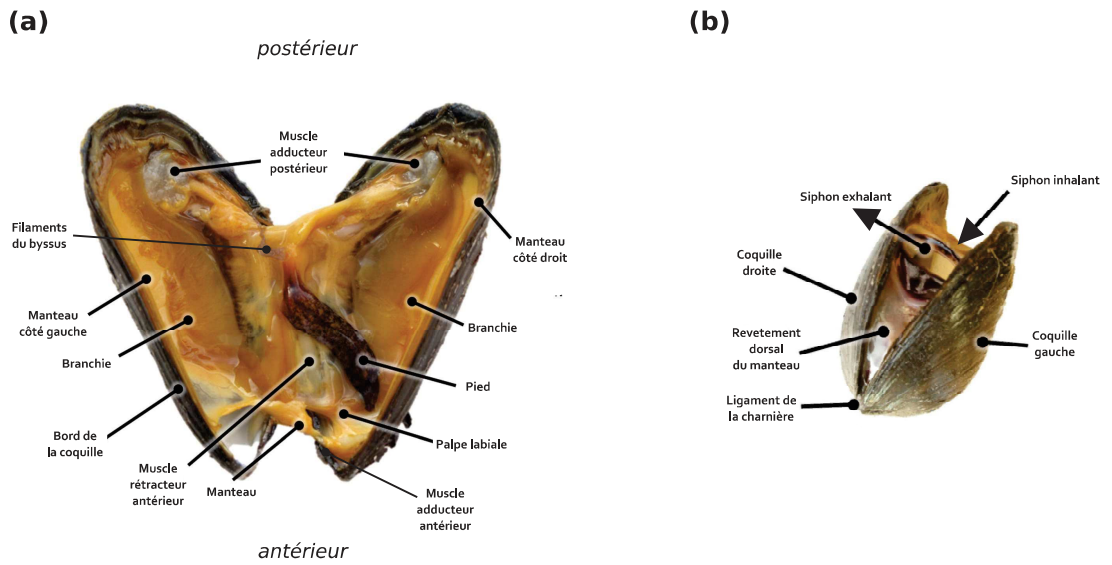


FIGURE 6 : Anatomie de la moule (*M. edulis*). Organisation en vue interne (a) et externe (b). Sur la (b), les flèches indiquent le sens de circulation de l'eau par les siphons inhalant et exhalant (modifié de (Eggermont et al., 2020))

prédation, ouverture en cas de nutrition). Les moules sont fixées au substrat grâce au byssus dont le liquide est produit dans leur glande byssogène et sécrété le long de leur pied pour former des filaments. Ce mécanisme leur permet également de se détacher puis se rattacher et ainsi se déplacer légèrement à l'aide de leur pied rétractile (jusqu'à une centaine de mètres, [Petrovic & Guichard, 2008](#)). Le manteau est la couche protectrice des organes internes qui constitue un tissu de réserve et est rempli de gamète au moment de la reproduction (voir section suivante). Le système circulatoire semi-ouvert est composé d'un péricarde et de nombreux vaisseaux qui alimentent les différents organes *via* l'hémolymphe⁵⁵. Les moules sont des organismes filtreurs qui se nourrissent d'algues planctoniques. La filtration se caractérise par un flux d'eau régulé selon les besoins de l'animal. L'eau chargée en nutriments entre par le siphon inhalant, circule dans la cavité palléale et ressort par le siphon exhalant permettant notamment l'évacuation des déchets ([FIGURE 6](#)). Durant ce processus, les aliments sont incorporés dans le mucus (à la surface des branchies) et acheminés jusqu'aux palpes labiaux et la bouche. Ce flux d'eau permet également aux branchies de capter l'oxygène et assure ainsi la respiration ([Gosling, 2003](#)).

Quelques caractéristiques morphologiques permettent de différencier imparfaitement les espèces. Notamment, le bord du manteau apparaît plutôt marron ou blanc chez *M. edulis* et violet-noir chez *M. galloprovincialis*. De plus, *M. edulis* est caractérisé par une coquille plus allongée (rapport longueur:largeur faible) présentant des bandes de couleur bleue tandis que *M. galloprovincialis* a une coquille élargie (rapport longueur:largeur élevé) de couleur homogène. Cependant, les hybrides sont difficiles à distinguer sur ces critères. Bien qu'indicative et compte-tenu de l'important taux d'hybridation, les caractéristiques morphologiques apparaissent peu satisfaisantes au regard des outils génétiques actuels.

3.3 Cycle biologique

Les moules *Mytilus* sont des organismes gonochoriques à fécondation externe. En effet, lorsque les conditions sont propices, mâles et femelles relâchent de manière synchrone leurs gamètes dans l'eau (cela caractérise la « ponte »). Après la fécondation plusieurs stades larvaires se succèdent sur une trentaine de jours : trocophore, D, véligère et pédivéligère. Les larves sont pélagiques et mobiles et peuvent parcourir de grandes distances au gré des courants (~50km en moyenne, [Gilg & Hilbish, 2003](#); [McQuaid & Phillips, 2000](#)) avant de se fixer et devenir des moules juvénile puis adulte. Les moules ont un cycle de reproduction annuel et sont capables de se reproduire dès leur première année de vie et ce

⁵⁵ Les cellules de l'hémolymphe sont les hémocytes qui jouent un rôle important dans la respiration, l'alimentation et l'immunité des moules (voir section 3.5.1), entre autre.

jusqu'à leur mort. Elles sont longévives et leur espérance de vie est estimée à plus de vingt ans ([Theisen, 1973](#)). Il y a une à deux périodes de reproduction dans l'année qui sont variables selon les espèces et les zones géographiques, et influencées par l'environnement et les conditions des individus ([Lubet, 1959](#)). Néanmoins, le cycle sexuel des moules suit plusieurs grandes étapes. Lubet décrivait en 1959 les différents stades pour les moules *M. edulis* (cette nomenclature a été utilisée par de nombreux auteurs par la suite): (i) **stade 0**, période de repos sexuel qui dure de juin à septembre et se caractérise par des follicules gonadiques vidés (à peine perceptibles) et l'accumulation de réserve dans le tissu conjonctif ; (ii) **stade I**, période de multiplication des gonies (septembre-octobre) ; (iii) **stade II**, phase de développement gamétique (oogénèse et spermatogénèse) et d'appauvrissement des réserves (octobre-décembre) ; (iv) **stade III**, période de reproduction allant de décembre à juin et qui se divise en sous-stades, **III-A1** présence d'une majorité de gamètes matures mais d'une insensibilité aux stimuli de ponte, **III-A2** atteinte de la maturité gamétique et d'une sensibilité aux stimuli de ponte, **III-B** stade de vidange où les follicules gamétiques se vident complètement (ponte, février-mars), **III-C** phase de restauration de la gonade avant une nouvelle phase de ponte (mars-avril), **III-D** c'est la fin de la reproduction et les tissus de réserves sont totalement épuisés (mai-juin). Les périodes de pontes s'accompagnent d'un épuisement des réserves et rende les animaux plus sensibles aux stress extérieurs ([Tremblay et al., 1998](#)).

La distinction entre mâles et femelles est optimale à la maturité des gonades. Un premier indicateur est la coloration du manteau (gorgé de gamètes) qui, au cours de la gamétogénèse, va progressivement vers une couleur blanche-jaune pour les mâles et rouge-orange pour les femelles ([Lubet, 1959](#)). Le déterminisme du sexe est cependant plus fiable par observation histologique (visible à tous les stades excepté le stade 0) ou par observation individuelle d'émission de gamètes.

3.4 Immunité

Comme nous venons de le voir, les moules sont des organismes filtreurs et sessiles en contact permanent avec le milieu extérieur et donc avec une grande variété de microorganismes potentiellement pathogènes, de parasites et de contaminants (pour une revue voir [Lupo et al., 2021](#)). Pour y faire face, les premières lignes de défense sont les barrières physiques que constituent la coquille, le mucus et les épithélia. Une fois dans l'organisme les agents pathogènes ou les contaminants sont reconnus et éliminés par des réponses humorales et cellulaires du système immunitaire.

Le système immunitaire correspond à l'ensemble des mécanismes de défense d'un organisme face l'invasion d'agents extérieurs. Les vertébrés possèdent deux types de réponses immunitaires complémentaires: l'immunité innée et l'immunité adaptative. Lors d'une infection, les agents

pathogènes sont rapidement reconnus et éliminés par le système inné et, si l'infection persiste, les cellules de l'immunité adaptative sont secondairement recrutées (lymphocytes T et B). Les invertébrés ne possèdent pas d'immunité adaptative basée sur la production d'anticorps et d'une multiplication clonale de lymphocytes, et leur défense repose uniquement sur une immunité innée. L'efficacité, la spécificité et la mémoire que confère l'immunité adaptative chez les vertébrés a longtemps minimisé le rôle de l'immunité innée. Cependant, au cours des dernières décennies cette vision dichotomique et simpliste de l'immunité a été remise en question au travers de l'étude de l'immunité des invertébrés, notamment depuis de la découverte des récepteurs impliqués dans la reconnaissance des agents pathogènes par les cellules de l'immunité innée jusqu'à la mise en évidence de mécanismes de diversification moléculaire et de mémoire (Miccoli et al., 2021; Pradeu & Du Pasquier, 2018).

3.4.1 Les hémocytes : cellules effectrices de l'immunité

Les hémocytes sont les cellules circulantes de l'hémolymphe qui ont la capacité de s'infiltrer dans les tissus pour y assurer de multiples fonctions. Essentielles dans le maintien de l'homéostasie, ces cellules ont un rôle dans la respiration, le transport et l'assimilation des nutriments, l'osmorégulation, l'élimination des déchets, la réparation des tissus et de la coquille et les défenses immunitaires (Gosling, 2003). Les hémocytes possèdent de nombreuses fonctions qui leur confèrent un rôle majeur dans les mécanismes de défenses chez les moules. Parmi ces fonctions on peut citer (i) la chimiotaxie, (ii) la reconnaissance de particules étrangères par des récepteurs membranaires et solubles, (iii) l'activation de cascades de signalisation intracellulaires, (iv) l'opsonisation, (v) la phagocytose et l'encapsulation et (vi) la dégradation intracellulaire des corps étrangers (Bouallegui, 2019; Donaghy et al., 2009). Une des premières réactions observées suite à un stress chez les bivalves est une augmentation de la quantité d'hémocytes circulant et une infiltration hémocytaire au sein des différents tissus affectés (Mayrand et al., 2005).

Bien que les hémocytes aient un rôle central chez les mollusques, il n'existe pas de consensus sur la classification des différents types cellulaires, de leur lignage et de la nature du tissu hématopoïétique. Cependant, basé sur des critères morphologiques et structuraux, l'ensemble des descriptions réalisées désignent deux principaux types hémocytaires (FIGURE 7): les granulocytes et les agranulocytes (Burioli et al., 2019; Carballal et al., 1997; Le Foll et al., 2010; Pila et al., 2016; Pipe et al., 1997). Les granulocytes sont caractérisés par la présence de granules dans un cytoplasme de couleur claire, d'un noyau

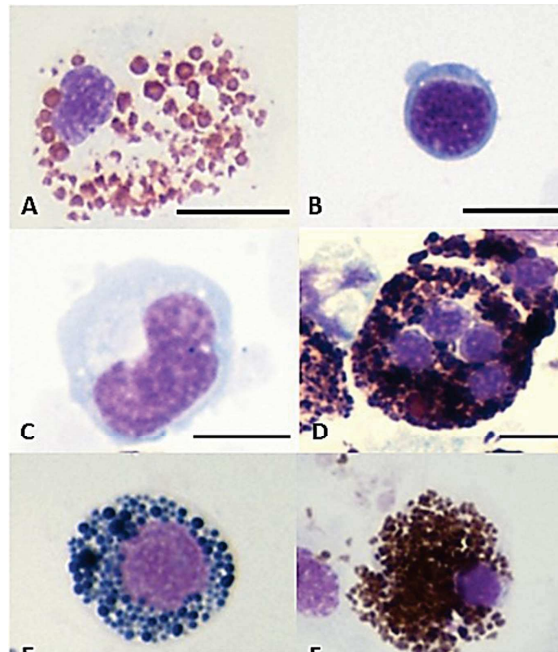


FIGURE 7 : Morphologie des cellules circulantes de l'hémolymphe (hémocytes). Observation cytologique avec coloration May-Günwald Giemsa (tiré de Burioli et al. 2019). (A) granulocyte éosinophile, (B) petit agranulocyte, (C) grand agranulocyte, (D) granulocytes éosinophyle plurinuclée, (E) granulocyte basophile, (F) granulocyte de type *brown cell*. Barre = 10 μm

sphérique unique⁵⁶ et d'un rapport noyau/cytoplasme faible. L'utilisation de coloration de type May-Günwald Giemsa permet de révéler une diversité de granulations dont la taille, le nombre et la coloration varient et permettent de décrire différentes sous-populations : (i) les granulocytes éosinophiles, caractérisés par granules roses, et qui apparaissent majoritaires dans l'hémolymphe, (ii) les granulocytes basophiles, caractérisés par la présence de granules bleues et (iii) les *brown cells* caractérisées par la présence des granules de couleur brune, les deux derniers n'étant observés que très rarement. Les agranulocytes (ou hyalinocytes) sont caractérisés par l'absence de granule dans un cytoplasme basophile et possèdent un rapport noyau/cytoplasme élevé. Deux sous-populations se distinguent : (i) les petits agranulocytes, aussi appelés cellules blastiques (*blast-like cells*⁵⁷), qui sont caractérisés par un noyau central et sphérique et très peu de cytoplasme et (ii) les grands agranulocytes, qui sont caractérisés par un noyau ovoïde excentré et un cytoplasme plus abondant. Chez *M. edulis*, il a été montré qu'une grande majorité de l'activité de phagocytose est assurée par les granulocytes éosinophiles (dont les granules s'apparentent à des lysosomes, Noël et al., 1993).

3.4.2 Reconnaissance des agents pathogènes

L'activation de la réponse immunitaire passe par la reconnaissance de motifs associés aux pathogènes (ou corps étrangers en général) que l'on regroupe sous le terme de *Pathogen-associated Molecular Patterns* (PAMPs)⁵⁸. Il existe une grande diversité de PAMPs dont le type est associé à des pathogènes particuliers. C'est par exemple les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à gram négatif, les peptidoglycanes (PGN) des bactéries à gram positif, les mannanes des levures ou encore les acides nucléiques simple (ARN) ou double (ADN) brin des virus. L'organisme infecté va reconnaître ces motifs via des récepteurs que l'on nomme *Pattern Recognition Receptor* (PRR, [FIGURE 1.8](#)). Il existe une grande variété de PRRs qui se distinguent selon leur localisation : les protéines sécrétées, les protéines transmembranaires, et les protéines cytosoliques (Bouallegui, 2019; Gerdol & Venier, 2015).

⁵⁶ Des cas de granulocytes plurinucléés ont cependant été quelques fois observés (voir par exemple, Burioli et al. 2019).

⁵⁷ Par proximité morphologique avec les blastes qui sont des cellules non différenciées. Cependant, chez les moules aucun rôle fonctionnel n'a clairement été mis en évidence pour ce type cellulaire.

⁵⁸ Les microorganismes en interactions avec les organismes ne sont pas tous pathogènes et une majorité compose leur microbiote. On distingue aujourd'hui les *Microbe-Associated Molecular Pattern* (MAMPs) - motifs associés au microbiote qui ne nécessitent pas de réponse immunitaire, tous des PAMPs - des *Dangerous-Associated Molecular Pattern* (DAMPs) - motifs reconnus comme dangereux et nécessitant une réponse immunitaire, ce ne sont pas exclusivement des PAMPs.

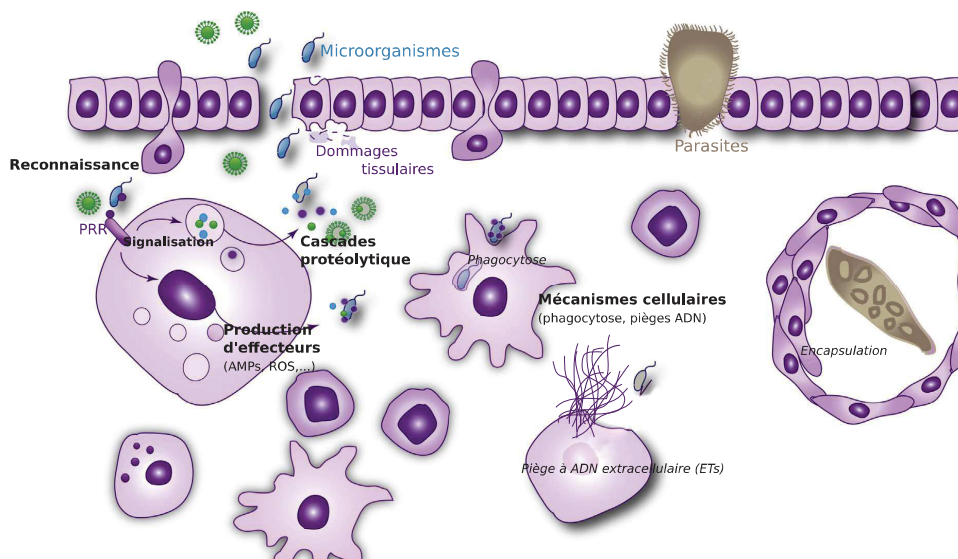


FIGURE 8 : Représentation schématique des principales étapes de la réponse immunitaire innée des mollusques. Une première étape de reconnaissance va entraîner une réponse immunitaire humorale et cellulaire qui mènera à l'élimination des corps étrangers (modifié de Escoubas et al. 2016)

Les PRRs secrétés sont des protéines de type lectine⁵⁹ connues pour favoriser l'interaction avec les hémocytes, la phagocytose via l'opsonisation, et les voies du système du complément des vertébrés. Elles représentent une grande fraction du transcriptome des bivalves et on y distingue plusieurs familles de protéines:

- **Les protéines à domaine C1q** (*C1q domain-containing*, C1qDC) sont des molécules associées au système du complément des vertébrés et pourraient jouer un rôle important dans l'immunité innée des invertébrés. Chez les bivalves, les C1qDC sont très diversifiées (168 transcrits chez la moule, [Venier et al., 2011](#)) et peuvent reconnaître une large gamme de bactéries, des champignons et des parasites eucaryotes. Chez *Mytilus galloprovincialis*, certains transcrits C1qDC ont été retrouvés surexprimés dans les hémocytes suite à une injection *in vivo* de bactéries ([Gerdol et al., 2011](#)). Bien que les C1qDC soient abondants, leur rôle fonctionnel n'est clairement pas élucidé et tous ne seraient pas nécessairement impliqués dans l'immunité.
- **Les lectines de type C** (*C-type lectins*, CTLs) sont associées à de nombreux processus biologiques et de reconnaissance, notamment des résidus glycosylés. De la même manière que les C1qDC, les CTLs chez les bivalves sont également diversifiés (154 transcrits chez la moule, [Gerdol et al., 2014](#)) et jouent un rôle dans l'agglutination et l'opsonisation de parasites ([Wang et al., 2011](#)). Néanmoins, certaines CTLs ont aussi été associées à d'autres fonctions telles que la fécondation ([Lima & McCartney, 2013](#)) ou la nutrition ([Pales Espinosa, Perrigault, & Allam, 2010](#)).
- **Les protéines liées au fibrinogène** (*Fibrinogen-related proteins*, FREPs) sont des molécules retrouvées chez les vertébrés⁶⁰ et les invertébrés. Chez les invertébrés les FREPs ont un rôle majeur dans la défense (agglutination, propriétés antibactériennes et l'alloreconnaissance, [Hanington & Zhang, 2011](#)). Plus de 150 FREPs ont été identifiés dans le transcriptome de *M. galloprovincialis* ([Gerdol & Venier, 2015](#)). En plus de présenter une grande diversité inter- et intra-individuelle, leur expression est augmentée à la suite d'infections bactériennes ou d'exposition à des PAMPs et présentent des propriétés d'opsonines ([Alejandro Romero et al., 2011](#)). Ces dernières années, cette molécule a abondamment été étudiée dans le cadre de l'interaction entre un gastéropode (*Biomphalaria glabrata*) et ses parasites (*Schistosoma sp.*) et révèle que cette famille de molécules est impliquée dans la compatibilité entre hôte et parasite, notamment grâce à la grande diversité de motifs ([Adema, 2015; Zhang et al., 2004](#)).

⁵⁹ Les lectines sont définies comme des protéines qui se lient spécifiquement à des sucres.

⁶⁰ Rôle dans la coagulation.

- **Les protéines de liaison aux bactéries à gram négatif** (*Gram-negative binding protein*, GNBPs) sont des molécules connues pour reconnaître les β -1,3-glucanes des bactéries et des champignons. Relativement peu étudiées chez les bivalves, des GNBPs se liant aux β -1,3-glucanes et LPS ont cependant été caractérisées chez l'huitre *Pinctata fucata* (D. Zhang et al., 2009). Trois GNBPs possibles ont été identifiées dans le transcriptome de *M. edulis* mais leur fonction reste inconnue (Philipp et al., 2012).
- **Les galectines, les lectines de type R et F** (R-type et F-type lectins) **et les protéines liées à l'apextrines** (*Apextrin-related proteins*, ApeC) sont d'autres types de molécules sécrétées dont le rôle fonctionnel dans l'immunité des moules est encore très mal connu. Cependant, chez certains bivalves, les galectines agiraient dans la reconnaissance des bactéries (Bai et al., 2019; Yamaura, Takahashi, & Suzuki, 2008) et des protozoaires (Tasumi & Vasta, 2007) et leur expression a été démontrée à la suite d'infection par des bactéries chez la moule (Tanguy et al., 2018).

Les PRRs à domaines transmembranaires sont les récepteurs responsables de l'activation de multiples cascades de signalisations qui stimulent l'expression des facteurs clés de la réponse immunitaire. Deux grandes catégories sont connues :

- **Les récepteurs de type Toll** (*Toll-like Receptor*, TLRs) sont des PRRs au rôle clé dans l'immunité des métazoaires notamment par leur capacité à reconnaître un large spectre de PAMPs. Leur structure est relativement bien conservée et se compose d'une région extracellulaire riche en leucine (*leucine-rich repeats*, LRRs), d'un region transmembranaire et d'un domaine intracellulaire nommé *Toll-interleukin-1-receptor* (TIR). La liaison d'un ligand à un TLR va engendrer le recrutement de molécules adaptatrices, comme MyD88 ou le complexe IKK, qui permettront l'activation de facteurs de transcription majeurs dans la régulation de la réponse inflammatoire et les mécanismes effecteurs de l'immunité innée. Parmi ces voies de signalisations dépendantes des TLR, la voie conservée Rel/NF- κ B a été bien décrite chez les mollusques (Escoubas et al., 2016). Chez les moules 27 et 23 TLRs ont été identifiés chez *M. edulis* et *M. galloprovincialis* respectivement (Philipp et al., 2012; Toubiana et al., 2013), ce qui correspond au double de ceux des vertébrés. Néanmoins, leur spécificité de ligands respectifs n'a pas encore été décrite.
- **Les protéines de reconnaissance du peptidoglycane** (*Peptidoglycan recognition proteins*, PGRPs) sont des molécules qui reconnaissent spécifiquement les peptidoglycanes des bactéries

et sont présents chez les vertébrés et les invertébrés. Seulement trois transcrits de PGRPs ont été identifiés chez la moule (Gerdol & Venier, 2015) dont une est surexprimé à la suite d'une exposition à des bactéries (Martins et al., 2014). Cependant, leur rôle fonctionnel et les voies de signalisations impliquées sont encore peu connus chez les moules.

- **Les récepteurs scavenger** (*scavenger receptor*, SRs) sont associés à de multiples fonctions dont celle de reconnaître et d'éliminer les agents pathogènes via la phagocytose. Bien qu'ils soient en nombre relativement élevé dans le génome des bivalves, leur caractérisation fonctionnelle reste à réaliser.

La dernière catégorie de PRRs correspond à des molécules retrouvées dans le cytosol. Chez les bivalves, elles ont été associées à la reconnaissance de bactéries et de virus et sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaire. Parmi celles-ci les plus emblématiques sont :

- **Les récepteurs de type NOD** (*NOD-like receptors*, NLRs) sont des protéines intracellulaires capables de reconnaître des PAMPs présents dans le cytosol des cellules, soit suite à l'invasion intracellulaire d'un pathogène, soit via le transport de PAMPs au travers de la membrane plasmique. Les seuls bivalves pour lesquels des NLRs ont été reportés sont les moules *M. galloprovincialis* dont une seule séquence a été décrite à ce jour (Gerdol & Venier, 2015; Philipp et al., 2012).
- **Les récepteurs de type RIG** (*RIG-like receptors*, RLRs) sont des molécules de la famille des hélicases qui sont capables de reconnaître les ARNs double brin d'origine virale ou synthétique (ex. poly I:C). Chez la moule, des séquences complètes et partielles de RLRs ont été reportées chez *M. edulis* et *M. galloprovincialis* (Gerdol & Venier, 2015; Philipp et al., 2012).

Comme nous venons de le voir, les PRR ont majoritairement été décrits par homologie de séquence et la démonstration expérimentale de leur rôle fonctionnel est pour la plupart manquante. De plus, la majorité des PRRs ont été caractérisés dans le cadre d'infections bactériennes ou virales et en résulte une moins bonne connaissance des mécanismes de reconnaissances des parasites eucaryotes. Ainsi, dans le cadre d'un cancer transmissible de moules -microparasite eucaryotes génétiquement proche de son hôte- les voies de reconnaissance par le système immunitaire restent une question à part entière. Plus généralement, la question de l'existence de mécanismes d'histocompatibilité chez les mollusques bivalves reste également méconnue. Quelques études ont mis en évidence des distinctions du « soi » et du « non-soi » indiquant donc qu'un système de reconnaissance du soi est présent. Cependant, les bases

moléculaires de cette reconnaissance n'ont pas été identifiées à ce jour (Dishaw & Litman, 2009; Theodor, 1970).

3.4.3 Voies de signalisations et médiateurs de l'immunité

La reconnaissance des PAMPs par les PRRs initie de nombreuses voies de signalisation qui régulent l'activation transcriptionnelle de la réponse immunitaire et qui permettent la mise en place d'une réponse immunitaire coordonnée dans les tissus touchés. Les cellules immunitaires activées produisent alors diverses molécules sécrétées comme les cytokines (FIGURE 8).

Les cytokines sont des protéines solubles qui jouent un rôle majeur dans la communication entre les cellules de l'immunité. Ce sont des médiateurs qui régulent l'activité des cellules immunitaires à distance et permettent ainsi la coordination des différentes phases de la réponse immunitaire. Ce groupe de protéines hétérogènes comprend, entre autres, des interleukines (IL), des interférons (*interferon regulatory factors*, IRF), des facteurs de nécrose tumorale (*Tumor Necrosis Factor*, TNF) ou encore des chimiokines. Chez les mollusques, le rôle des différentes cytokines est encore mal connu. La plupart des cytokines connues chez les moules *Mytilus* ont été prédites fonctionnellement par étude de séquences (tel que IL-1, IL-8, TNF α , PDGF-AB, TGF- β -1) ou retrouvées dans le transcriptome (tel que IL-17 et des types IL-16, pour une revue voir Bouallegui, 2019; Gerdol & Venier, 2015). Il est à noter que de nombreuses isoformes d'IL-17 sont retrouvées chez les bivalves et ont été identifiées chez *M. galloprovincialis*, dont l'expression de certaines est induite lors d'une réponse immunitaire suite à une infection bactérienne (Saco et al., 2021). Parmi les chimiokines potentielles, les protéines de type MIF (*Migration Inhibitor Factor*) ont aussi été décrites chez *M. galloprovincialis*.

Chez les mollusques, la majorité des voies de signalisation des PRRs et des récepteurs aux cytokines est conservée et elles ont pu être reconstituées par homologie avec celles des vertébrés, et la fonctionnalité de certains éléments a pu être validée expérimentalement (Escoubas et al., 2016). Comme par exemple la voie de signalisation des récepteurs types Toll faisant intervenir la protéine MyD88 et dont de nombreux éléments sont retrouvés modulés suite à une infection bactérienne ou fongique (Toubiana et al., 2014). Parmi les voies de signalisation immunitaires qui ont été clairement identifiées on retrouve donc (i) les voies de différents type de PRRs, comme la voie TLR/NF κ B ou la voie RLRs/STING, ainsi que la voie JAK/STAT impliquée dans la réponse à de nombreuses cytokines, (ii) des voies impliquées dans la défense cellulaire comme les voies de l'apoptose et de l'autophagie, et enfin (iii) les éléments de la voie des ARN interférents (FIGURE 9). Les intermédiaires des différentes voies de

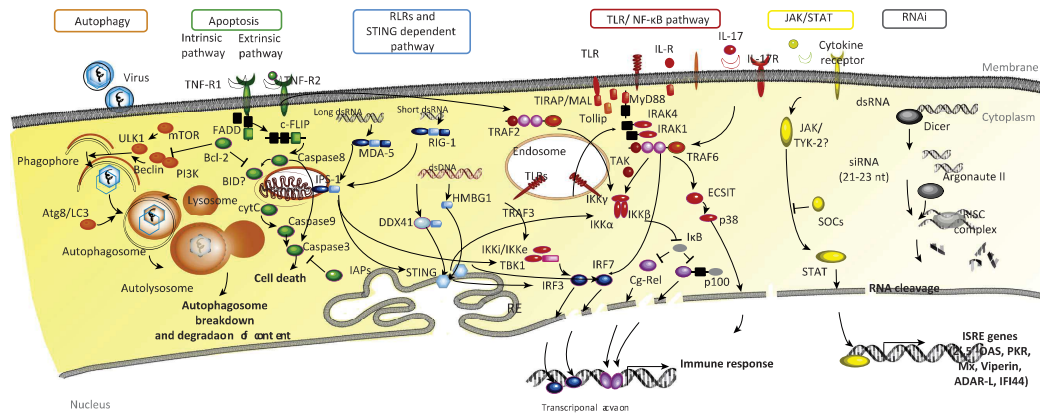


FIGURE 9 : Voies de signalisation conservée chez les mollusques (tiré de Escoubas et al. 2016)

signalisation sont donc nombreux et la modification de leur expression lors d'infection est souvent utilisée comme un indicateur de l'activation de réponses immunitaires.

3.4.4 *Élimination des agents pathogènes : les mécanismes effecteurs de défenses humorales et cellulaires*

La reconnaissance des corps étrangers engendre l'activation de voie de signalisation qui va *in fine* amener à leur élimination ([FIGURE 9](#)). Cette élimination peut se faire par le biais de différents mécanismes complémentaires via des molécules effectrices secrétées (défense humorale) et différents mécanismes cellulaires (défense cellulaire).

3.4.4.1 *Défenses humorales*

Les peptides antimicrobiens (*Antimicrobial peptides*, AMPs) sont des molécules de petites tailles au spectre d'activité assez large et particulièrement efficaces contre les infections microbiennes. Chez les moules, ces molécules ont largement été caractérisées et agissent principalement en perturbant la stabilité des parois bactériennes ou en formant des pores au niveau de la membrane plasmique. Six catégories ont été identifiées chez les moules : (i) les défensines, qui sont actives contre les bactéries et les champignons ; (ii) les mytilines, qui ont une couverture d'action large propre à chaque isoforme ; (iii) les myticines, qui sont très actives contre les bactéries à gram positif ; (iv) les mytimycines, qui sont spécifiquement antifongique ; (v) les mytimacines, qui sont actives contre les bactéries; et (vi) les big défensines (pour revue voir [Gerdol & Venier, 2015](#)). Les AMPs sont principalement produits soit dans les hémocytes et stockés dans des granules, soit au niveau des epithelia, et l'expression des différents AMPs varient selon les tissus (par exemple, les défensines sont majoritairement exprimées dans les hémocytes proches du tube digestif, [Mitta, Vandenbulcke, Hubert, & Roch, 1999](#); [Mitta et al., 2000](#)). Une autre catégorie de protéines agissant contre les bactéries sont les *Bactericidal/permeability increasing proteins* (BPIs) qui se lient au LPS et perméabilisent la membrane cytoplasmique des bactéries. Les analyses de transcriptomes ont prédits plusieurs séquences de BPIs chez *M. edulis* et *M. galloprovincialis* ([Gerdol & Venier, 2015](#); [Philipp et al., 2012](#)).

Les lysosymes sont de petites enzymes ayant également un rôle important contre les infections microbiennes. Chez les moules elles ont été reliés à une réponse antibactérienne ([Li et al., 2008](#)). Chez *M. edulis*, les lysozymes ont été localisés dans les granules des hémocytes et sont impliqués dans la dégradation des microorganismes phagocytés ([Pipe, 1990](#)).

Un autre mécanisme effecteur souvent associé à la réponse humorale, qui est propre aux invertébrés, est la réponse de mélanisation et le système des prophénoloxidasés (ProPO) qui produit des dérivés oxygénés toxiques pour de nombreux micro-organismes, et dont le rôle antibactérien et antiparasitaire a été identifié chez plusieurs espèces de bivalves (Luna-Acosta et al., 2017). Néanmoins ce mécanisme est souvent associé à une réponse cellulaire, de phagocytose ou d'encapsulation par les hémocytes ce qui souligne les nombreuses inter-dépendances des réponses humorales et cellulaires.

3.4.4.2 Défenses cellulaires

Chez les mollusques, l'agrégation des hémocytes au niveau du tissu lésé est l'une des premières réactions suite à une infection. La capacité de ces cellules à reconnaître les PAMPs puis à migrer, s'infiltrer et s'agréger permet de contenir l'infection et d'éviter la propagation des pathogènes dans l'organisme. Les hémocytes éliminent ensuite les pathogènes à travers différents mécanismes tels que la phagocytose, l'encapsulation, la formation de pièges à ADN (ETs), l'apoptose et l'autophagie (FIGURE 8).

La phagocytose est un processus cellulaire d'internalisation de particules étrangères de petites tailles (contaminants, toxines, bactéries, parasites unicellulaires, entre autres). Elle se déroule en trois étapes : (i) la reconnaissance directe (PAMPs/DAMPs) ou indirecte (opsonines) des particules par des récepteurs de phagocytose (de type CTLs, SRs ou intégrines principalement), (ii) l'internalisation et la formation du phagosome (qui implique des modifications du cytosquelette d'actine induisant le repliement de la membrane plasmique et sa fusion pour former une vacuole individualisée) puis (iii) l'élimination par différentes activités toxiques et composés anti-microbiens suite à la fusion du phagosome avec des lysosomes (formant le phagolysosome). Parmi les mécanismes anti-microbiens au sein du phagolysosome, on peut citer la production de radicaux oxygénés (via les DUOX et le complexe de la NADPH-oxydase membranaire) et radicaux azotés, l'accumulation de métaux comme le Cuivre et le Zinc qui sont toxiques pour de nombreux micro-organismes, l'activation d'hydrolases et de protéases via l'acidification du milieu intra-phagosomal, la présence de lysozymes et de certains AMPs et dans certains cas l'activation de phénol oxydases et de la mélanisation au niveau des phagolysosomes (pour revue voir Allam & Raftos, 2015).

Lorsque l'agent étranger est de taille trop importante pour être phagocyté, son contrôle et son élimination passeront par le biais de l'encapsulation. Ce processus implique plusieurs hémocytes qui vont entourer le parasite et sécrètent des produits cytotoxiques afin de l'éliminer et dans certains cas l'activation de la mélanisation (Dove, Bowser, & Cerrato, 2004). Bien que ce mécanisme soit observé

chez de nombreux bivalves (Vazquez, Vázquez, & Cremonte, 2017), ses bases moléculaires ne sont cependant pas bien connues.

La mort cellulaire est un mécanisme fondamental pour l'homéostasie des organismes qui joue aussi un rôle dans l'immunité. Chez les mollusques, l'apoptose et l'autophagie sont induites par des changements environnementaux tels que des variations de salinité, des expositions à des contaminants ou toxines, l'hypoxie, et la présence de bactéries, virus et parasites (Carella, Feist, Bignell, & De Vico, 2015; A. Romero, Novoa, & Figueras, 2015). Dans le cas d'une infection, ces mécanismes permettent d'éviter la réplication intracellulaire de l'agent pathogène et donc de limiter son envahissement dans l'organisme. L'apoptose est un mécanisme cellulaire très conservé ce qui a permis de caractériser ses bases moléculaires chez la moule (FIGURE 9). Elle peut être activée par des voies différentes, soit par la voie intrinsèque, via la libération de cytochrome C par la mitochondrie qui impliquent à leur tour différentes caspases, soit par la voie extrinsèque, suite à la reconnaissance de ligands sur des récepteurs de type *Tumor Necrosis Factor* (TNF-R) et impliquent également d'autres caspases. L'autophagie, qui a d'abord été découverte comme un mécanisme de réponse à une carence en nutriments au niveau cellulaire, est connue pour être impliquée dans l'immunité innée des vertébrés. Ce processus ne mène pas nécessairement à la mort cellulaire et se traduit par la formation d'un autophagosome, enfermant des particules étrangères cytosoliques, qui peuvent ensuite fusionner avec les lysosomes et dégrader le contenu via des enzymes. Bien que l'autophagie soit présente et stimulée suite à des infections virales chez les bivalves (Moreau et al., 2015), son implication exacte dans l'immunité reste encore mal connue et reste considérée pour le moment comme un mécanisme antiviral.

4. Contexte, problématiques et objectifs de la thèse

La compréhension de la biologie du cancer est un enjeu majeur à l'heure où il deviendra bientôt la première cause de mortalité humaine. Longtemps considérée comme une maladie chronique et fonctionnelle, le cancer peut en réalité être considéré comme une entité à part entière qui interagit avec son environnement et évolue au cours du temps. Son étude par les sciences de l'évolution émerge peu à peu et ce nouvel angle d'étude nous permettra peut-être de mieux le comprendre et l'appréhender. Plus largement, il est de plus en plus admis que le cancer peut influencer les traits d'histoire de vie des organismes, leurs interactions avec d'autres organismes, leur évolution et *in fine* avoir des impacts à l'échelle des écosystèmes. Dans cette idée, l'étude des cancers transmissibles représente une bonne opportunité pour comprendre l'évolution à long terme d'une cellule revenue à une vie unicellulaire ainsi que son interaction avec les populations d'hôtes. Les précédentes découvertes soulèvent de nombreuses

questions sur l'écologie, la dynamique évolutive et les mécanismes d'interaction de ces cancers particuliers, notamment sur les paramètres qui pourraient favoriser leur émergence (parfois multiple), leur transmission (parfois inter-espèces) ou encore leurs impacts sur l'évolution des populations hôtes. En effet, on est à même de se demander : Comment et pourquoi émergent-ils ? A quel rythme ? Depuis combien de temps évoluent-ils ? Certains environnements favorisent-ils la transmission de lignées cancéreuses et donc leur émergence ? Faut-il un fort apparemment et/ou des protections immunitaires réduites pour favoriser l'émergence de la lignée transmissible ? Dans quelle mesure la transmission interspécifique est-elle possible ? Quels sont les impacts sur l'évolution des hôtes ? Quels sont les dynamiques de coévolution hôte-cancer ?

Ce projet de thèse a démarré suite à la découverte de multiples lignées de cancers transmissibles BTN, chez différentes espèces de bivalves marins dont la moule, qui suscitent de nombreuses questions fondamentales sur l'écologie et l'évolution de ces cancers et des interactions avec les populations d'hôtes. En France, la présence du cancer transmissible d'origine *M. trossulus* a été suspectée par des analyses de génétique des populations (Riquet et al., 2017). Peu de temps avant (2014), un épisode de mortalité massive d'origine inconnue est survenu et des anomalies cytogénétiques (pouvant impliquer des cancers) ont été corrélées aux taux de mortalité (Benabdelmouna & Ledu, 2016). Dans ce contexte plusieurs questions se sont alors posées : le BTN d'origine *M. trossulus* (MtrBTN) retrouvé sur la côte Pacifique du Canada est-il présent dans les populations *M. edulis* en France ? Existe-il d'autres émergences ? Quelle est la distribution et la prévalence des potentielles multiples lignées ? Les autres espèces de moules européennes sont-elles également touchées ? Les mortalités pourraient-elles s'expliquer par ce(s) cancer(s) ? Quels sont le(s) voie(s) de transmission ? Y a-t-il des facteurs écologiques ou environnementaux pouvant favoriser la transmission ? Existe-il une réponse anticancéreuse chez les moules ? Est-ce que cela influence la distribution du cancer et la dynamique des populations hôtes ?

Ce travail de thèse s'inscrit donc au démarrage de l'étude des cancers transmissibles de moules. En combinant plusieurs disciplines (écologie, biologie évolutive, biologie des interactions) j'ai pu aborder diverses questions relatives au cancer transmissible lui-même mais aussi à ses hôtes. Un des premiers enjeux de la thèse a été de développer un outil de diagnostic rapide pour mettre en évidence le cancer transmissible dans les populations de moules. Il a ensuite été question de rechercher l'existence du MtrBTN dans les populations de moules d'Europe, d'en estimer sa prévalence, d'appréhender sa distribution et d'évaluer les facteurs environnementaux associés aux populations hôtes touchées. Enfin, dans l'idée d'étudier l'interaction hôte-cancer plus directement, il a été question d'examiner la réponse

immunitaire des hôtes face à une infection par le cancer. Il est important de noter que les connaissances au démarrage et dans la suite de la thèse ont énormément évolué et les choix seront souvent justifiés au regard de la chronologie des connaissances.

Les mises au point méthodologiques visant à identifier des individus cancéreux dans les populations naturelles ou d'élevage et de les maintenir au laboratoire ont occupé une partie conséquente de ma thèse. Elles sont implicitement décrites dans les différents chapitres et ont été facilitées grâce à différentes collaborations. Finalement, la détection par étude cytologique de l'hémolymphe et amplification PCR de gènes spécifiques du cancer ou de *M. trossulus* est apparue la plus concluante. Nous avons ainsi pu cribler plusieurs zones ateliers et tenter la mise en place d'un vivier de cancers au laboratoire. Bien que la transmission expérimentale par injection de cellules cancéreuses fonctionne, le maintien des animaux receveurs sur plusieurs mois et le passage du cancer sur plusieurs générations de transferts expérimentaux se sont avérés plus complexe à mettre en œuvre. La nécessité de s'approvisionner directement sur le terrain pour les expérimentations a donc été un challenge supplémentaire.

Les **chapitres 1 et 2** abordent les questions relatives à la distribution et la prévalence de cancer(s) transmissible(s) en Europe. Dans le **chapitre 1**, nous avons génotypé plus de 5000 moules (*M. edulis*, *M. galloprovincialis* et leurs hybrides) dans le but de chercher l'existence de cancer(s) transmissible(s) -de toutes origines, *M. trossulus* mais aussi des deux autres espèces- et d'étudier les génotypes cancéreux. En parallèle, un travail auquel j'ai contribué a montré l'existence de deux émergences indépendantes de cancers transmissibles (tous deux d'origine *M. trossulus*) : MtrBTN1, retrouvé en Colombie-Britannique dans des populations *M. trossulus* ; et MtrBTN2, retrouvé dans *M. edulis* en France et *M. chilensis* en Patagonie (article en **annexe 1**). Pour ce qui est de l'étude du **chapitre 1**, nous avons trouvé le MtrBTN2 en faible prévalence (<1%) et aucun autre BTN n'a été mis en évidence. Nous avons également des données histologiques qui ont permis de mettre en évidence des cancers classiques « non-transmissibles ». L'étude des génotypes de MtrBTN2 a ensuite permis de mettre en évidence un fort polymorphisme, l'existence de deux sous-lignées, qui coexistent en Europe, et indique une émergence ancienne (mais difficile à dater ici). De plus, la prévalence entre les deux espèces s'est avérée très différente : de l'ordre de 1/100 chez *M. edulis* et de 1/1000 chez *M. galloprovincialis*, et une prévalence intermédiaire chez les hybrides. Ce résultat nous a poussé à réaliser un criblage à plus fine échelle sur une zone hybride où les deux espèces coexistent et peuvent s'hybrider (Bretagne Sud et Vendée). En plus de la diversité de fonds génétiques de cette zone, elle abrite des habitats aux paramètres

environnementaux variés (exposition aux vagues, salinité, courant, etc.) et des sites plus ou moins anthropisés (ports, élevage, bancs naturels, etc.). Le **chapitre 2** aborde ce criblage, de près de 1500 moules issues de 76 sites différents, réalisé par amplification PCR (PCR temps réelle et digital PCR) d'un gène nucléaire et d'un gène mitochondrial. Une nouvelle fois, la prévalence s'est révélée faible (1.5%) mais la majorité des sites touchés par le cancer se sont révélés être des ports de plaisance et commerciaux. Ces résultats inattendus apportent des éléments qui aideront à terme à mieux comprendre la dynamique épidémiologique de ce cancer. La question du lien entre la prévalence et le fond génétique ne sera cependant pas abordée dans ce manuscrit car le génotypage des individus n'est pas encore achevé.

Les **chapitres 3 et l'annexe 2** portent sur l'étude des hôtes et plus particulièrement de la réponse immunitaire suite à une allogreffe et xenogreffe de cellules saines et une xenogreffe de cellules cancéreuses. Cette composante est en effet importante pour comprendre la dynamique de transmission et de propagation de ce cancer transmissible. Dans le **chapitre 3**, nous avons réalisé des injections expérimentales de cellules de MrtBTN2 dans une soixantaine de moules saines *M. edulis* et avons laissé la maladie se développer pendant 25 jours. A l'issue de cette période nous avons réalisé des prélèvements cytologiques, histologiques et transcriptomiques (RNAseq) de chaque individu receveurs. Plusieurs stades ont été observés chez les receveuses allant de quelques cellules au point d'injection à une expansion dans plusieurs organes. L'analyse d'expression transcriptomique semble montrer une réponse inflammatoire prolongée (stress oxydatif), une réponse immunitaire de type humorale, et un remodelage des tissus musculaires, dans les individus receveurs comparés aux individus contrôles. Au-delà de la réponse anti-cancéreuse, la question de l'histocompatibilité chez les moules reste peu documentée et semble essentielle pour la compréhension de l'émergence des BTN. L'**annexe 2** résume les expérimentations réalisées pour aborder cette question, qui ont consisté à effectuer différents types d'injections d'hémocytes sains (*M. edulis*, *M. galloprovincialis* et *C. gigas*) dans des moules *M. edulis* saines. Les individus receveurs ont ensuite été prélevés 3h et 24h après injections pour réaliser des analyses transcriptome (RNAseq). Par contrainte de temps, l'analyse de ces données n'a pas pu être finement réalisée mais semble montrer une faible réponse immunitaire des hôtes.

--- Chapitre 1 ---

**A la recherche des cancers transmissibles de moules
Mytilus en Europe**

1. Contexte et objectifs

Au démarrage de cette thèse, une lignée de cancer transmissible d'origine *Mytilus trossulus* avait été mise en évidence dans une population *M. trossulus* de Colombie Britannique (Metzger et al., 2016) et sa présence avait été suspectée dans les populations *M. edulis* en Europe (Riquet et al., 2017). Le premier objectif de la thèse a donc été de rechercher l'existence d'un cancer transmissible *M. trossulus* dans les populations de *M. edulis* et *M. galloprovincialis* en Europe. Étant donné que cinq lignées de cancers transmissibles venaient d'être décrites chez les bivalves, nous avons également recherché de potentielles nouvelles lignées non décrites. Pour cela, nous avons génotypé plus de 5000 moules issues de plus de 200 populations sur 106 SNPs diagnostics⁶¹, et mis au point une méthode de détection de chimérisme qui est une caractéristique des cancers transmissibles. Dans un second temps, cela nous a permis d'étudier les génotypes des individus cancéreux détectés afin d'étudier l'histoire évolutive de(s) cancer(s) détecté(s). En parallèle de ce travail, une étude à laquelle j'ai contribué a montré l'existence de deux émergences indépendantes de cancers transmissibles (tous deux d'origine *M. trossulus*): MtrBTN1⁶², retrouvé en Colombie-Britannique dans des populations *M. trossulus* ; et MtrBTN2, retrouvé dans *M. edulis* en France et *M. chilensis* en Patagonie (article en **annexe 1**). Par la suite, le MtrBTN2 a également été retrouvé dans les populations *M. trossulus* présentes en mer du Japon (Skazina et al., 2021).

L'implication du cancer transmissible *M. trossulus* dans les mortalités de moules en France a rapidement été écartée du fait de la faible prévalence retrouvée, notamment dans des sites fortement impactés par ces mortalités (Charles, 2019), et de l'absence de chimérisme *M. trossulus* dans plus de 300 moules moribondes analysées (Pepin et al., 2017).

2. Résumé de l'article

Dans cette étude, nous avons donc réalisé une détection de chimérisme génétique en génotypant 106 SNPs sur 5 907 moules européennes. L'analyse génétique nous a permis d'obtenir simultanément le génotype des hôtes – *M. edulis*, *M. galloprovincialis* ou leurs hybrides - et le génotype des tumeurs des individus les plus fortement infectés. De plus, un sous-ensemble de 222 individus a systématiquement été génotypé et analysé par histologie afin de dépister d'éventuels cancers non transmissibles. D'une

⁶¹ Les SNPs utilisés permettent de discriminer le trio d'espèces *Mytilus* impliqués dans cette étude (*M. trossulus*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis*) et les différentes sous-lignées présentes en Europe.

⁶² *Mytilus trossulus* Bivalve Transmissible Neoplasia




part, nous avons détecté MtrBTN2 en faible prévalence chez *M. edulis*, mais également chez *M. galloprovincialis* et leurs hybrides à une prévalence beaucoup plus faible. De plus, aucun MtrBTN1 ou nouveau BTN n'a été détecté, mais huit individus atteints de néoplasie non transmissible ont été observés sur un même site pollué à une même date d'échantillonnage. D'autre part, nous avons observé une importante diversité au sein des génotypes des différentes tumeurs MtrBTN2, qui semblaient plus introgressés ou plus ancestraux que les MtrBTN1 et les individus sains *M. trossulus* de référence. En d'autres termes, le MtrBTN2 apparaît plus *M. edulis* que les populations *M. trossulus* de référence. L'interprétation la plus parcimonieuse de ce polymorphisme observé est la présence d'allèles nuls somatiques causés par des variations structurelles ou des mutations ponctuelles dans les sites d'hybridation des amorces PCR conduisant à une meilleure détection des allèles de l'hôte. Malgré la faible prévalence (<1%), nous avons pu décrire que deux sous-lignées divergentes de 10% d'allèles nucléaires nuls fixés et d'une substitution non synonyme sur le gène mitochondrial mtCOI (cytochrome oxydase I mitochondriale) se côtoient dans la même zone géographique, ce qui suggère une diversification complexe du MtrBTN2 depuis son émergence et le changement d'espèce hôte vers *M. edulis*.

3. Article 1

Cet article a été publié dans le journal *Molecular ecology* (2022). Il a été sélectionné par le comité éditorial pour faire l'objet d'un « News and Views ».

Hammel, M., Simon, A., Arbiol, C., Villalba, A., Burioli, E. A. V., Pépin, J.-F., Lamy, J.-B., Benabdelmouna, A., Bernard, I., Houssin, M., Charrière, G. M., Destoumieux-Garzon, D., Welch, J. J., Metzger, M. J., Bierne, N. (2022). Prevalence and polymorphism of a mussel transmissible cancer in Europe. *Molecular Ecology*, 31(3), 736-751. <https://doi.org/10.1111/MEC.16052>

Prevalence and polymorphism of a mussel transmissible cancer in Europe

Maurine Hammel^{1,2}  | Alexis Simon¹  | Christine Arbiol¹ | Antonio Villalba^{3,4,5} | Erika A. V. Burioli^{2,6}  | Jean-François Pépin⁷  | Jean-Baptiste Lamy⁸  | Abdellah Benabdelmouna⁸ | Ismael Bernard⁹  | Maryline Houssin⁶ | Guillaume M. Charrière²  | Delphine Destoumieux-Garzon²  | John J. Welch¹⁰ | Michael J. Metzger¹¹ | Nicolas Bierne¹ 

¹ISEM, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

²IHPE, Univ Montpellier, CNRS, Ifremer, Univ Perpignan, Perpignan, France

³Centro de Investigacións Mariñas, Consellería do Mar, Xunta de Galicia, Vilanova de Arousa, Spain

⁴Departamento de Ciencias de la Vida, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Spain

⁵Research Centre for Experimental Marine Biology and Biotechnology (PIE), University of the Basque Country (UPV/EHU), Plentzia, Basque Country, Spain

⁶LABÉO, Caen, France

⁷Laboratoire Environnement ressources des Pertuis Charentais, IFREMER, La Tremblade, France

⁸Santé, Génétique, Microbiologie des Mollusques, IFREMER, La Tremblade, France

⁹Eurêka Mer, Lézardrieux, France

¹⁰Department of Genetics, University of Cambridge, Cambridge, UK

¹¹Pacific Northwest Research Institute, Seattle, Washington, USA

Correspondence

Maurine Hammel, ISEM, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France.
Email: maurine.hammel@umontpellier.fr

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-18-CE35-0009; Montpellier Université d'Excellence; Conseil Régional de Normandie, LabEx CeMED

Abstract

Transmissible cancers are parasitic malignant cell lineages that have acquired the ability to infect new hosts from the same species, or sometimes related species. First described in dogs and Tasmanian devils, transmissible cancers were later discovered in some marine bivalves affected by a leukaemia-like disease. In *Mytilus* mussels, two lineages of bivalve transmissible neoplasia (BTN) have been described to date (MtrBTN1 and MtrBTN2), both of which emerged in a *Mytilus trossulus* founder individual. Here, we performed extensive screening of genetic chimerism, a hallmark of transmissible cancer, by genotyping 106 single nucleotide polymorphisms of 5,907 European *Mytilus* mussels. Genetic analysis allowed us to simultaneously obtain the genotype of hosts – *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* or hybrids – and the genotype of tumours of heavily infected individuals. In addition, a subset of 222 individuals were systematically genotyped and analysed by histology to screen for possible non-transmissible cancers. We detected MtrBTN2 at low prevalence in *M. edulis*, and also in *M. galloprovincialis* and hybrids although at a much lower prevalence. No MtrBTN1 or new BTN were found, but eight individuals with nontransmissible neoplasia were observed at a single polluted site on the same sampling date. We observed a diversity of MtrBTN2 genotypes that appeared more introgressed or more ancestral than MtrBTN1 and reference healthy *M. trossulus* individuals. The observed polymorphism is probably due to somatic null alleles caused by structural variations or point mutations in primer-binding sites leading to enhanced detection of the host alleles. Despite low prevalence, two sublineages divergent by 10% fixed somatic null alleles and one nonsynonymous mtCOI (mitochondrial cytochrome oxidase I) substitution are cospreading in the same geographical area, suggesting a complex diversification of MtrBTN2 since its emergence and host species shift.

KEYWORDS

disseminated neoplasia, genetic chimerism, genetic polymorphism, *Mytilus* sp. mussels, transmissible cancer

1 | INTRODUCTION

Transmissible cancers are malignant cell lines, derived from a founder host, which can spread and colonize other individuals by transmission of living cancer cells. Several lineages of transmissible cancer have been described: one in dogs (canine transmissible venereal tumour, CTVT, Murgia et al., 2006; Rebbeck et al., 2009), two in Tasmanian devils (devil facial tumour disease, DFT1 and 2, Pearse & Swift, 2006; Pye et al., 2016) and, more recently, seven in different bivalve species (bivalve transmissible neoplasia, BTN, Garcia-Souto et al., 2021; Metzger et al., 2015, 2016; Yonemitsu et al., 2019). The three lineages found in vertebrates are the best studied to date. In dogs, CTVT arose about 4,000–8,000 years ago and spread worldwide (Baez-Ortega et al., 2019; Leathlobhair et al., 2018). In Tasmanian devils, two independent transmissible cancer lineages have emerged in the last 30 years. In both cases, although at different spatiotemporal scales, genome studies have shown early diversification into sublineages and secondary coexistence of some divergent sublineages (Baez-Ortega et al., 2019; Kwon et al., 2020; Patton et al., 2020). Studies in marine bivalves also showed multiple emergences (two in *Cerastoderma edule*, Metzger et al., 2016 and two in *Mytilus trossulus*, Yonemitsu et al., 2019) and, for the first time in transmissible cancer research, transmissions crossing the species barrier (BTN lineage in *Polinitapes aureus* has a *Venerupis corrugata* origin, Metzger et al., 2016, MtrBTN2 in *Mytilus edulis* and *M. chilensis* has an *M. trossulus* origin, Yonemitsu et al., 2019, and BTN lineage in *Venus verrucosa* has a *Chamelea gallina* origin, Garcia-Souto et al., 2021).

The *Mytilus edulis* complex of species is composed of three species in the northern hemisphere: *M. edulis*, *M. galloprovincialis* and *M. trossulus*, and three species in the southern hemisphere: *M. chilensis*, *M. platensis* and *M. planulatus*. They are incompletely reproductively isolated and can hybridize when they come into contact, either naturally or via human-induced introductions (Fraïsse et al., 2016; Popovic et al., 2020; Simon et al., 2020). Disseminated neoplasia (DN) has been previously observed in four of these species around the world: *M. trossulus* (Elston et al., 1992; Moore et al., 1991; Rasmussen, 1986; Sunila, 1987; Usheva & Frolova, 2000; Vassilenko & Baldwin, 2014), *M. chilensis* (Campalans et al., 1998; Cremona et al., 2015; Lohrmann et al., 2019), *M. edulis* (Elston et al., 1988; Farley, 1969; Galimany & Sunila, 2008; Green & Alderman, 1983; Lowe & Moore, 1978) and *M. galloprovincialis* (Carella et al., 2013; Carrasco et al., 2008; Figueras et al., 1991; Gombač et al., 2013; Matozzo et al., 2018; Villalba et al., 1997). Cancer cells are characterized by rounded, basophilic and polyploid cells with a high nucleus-to-cell ratio (for a review see Carballal et al., 2015) and their presence is determined by histological observation, and cytology or flow cytometry of haemolymph (Benabdelmouna & Ledu, 2016; Benabdelmouna et al., 2018; Burioli et al., 2019). However, to demonstrate that a cancer is transmissible, a genetic study is required in order to identify (i) genetic differences between tumour and host cells and (ii) genetic similarity between tumours of different individuals (the hallmark of transmissible cancer). Thus,

two independent lineages of BTN from two *M. trossulus* founder mussels have been described in three mussel species: one lineage (MtrBTN1) found in East Pacific *M. trossulus* populations, and the other lineage (MtrBTN2) with a worldwide distribution in West Pacific *M. trossulus* populations, European *M. edulis* and South American *M. chilensis* hosts (Metzger et al., 2016; Skazina et al., 2021; Yonemitsu et al., 2019). MtrBTN1 was discovered in *M. trossulus* populations in western Canada based on genetic similarity of neoplastic haemocytes at one mitochondrial and one nuclear locus (Metzger et al., 2016). Although disseminated neoplasia was first described 50 years ago in *Mytilus* sp. (Farley, 1969) we do not know if cases of disseminated neoplasia reported before Metzger et al. (2016) correspond to transmissible cancers. A population genetic study of French mussels detected chimeric individuals with an abnormal presence of *M. trossulus* alleles in *M. edulis* populations devoid of *M. trossulus* individuals, leading the authors to hypothesize the presence of an *M. trossulus* transmissible cancer (Riquet et al., 2017). The presence of *M. trossulus* transmissible cancer in *M. edulis* was later confirmed by the detection of an *M. trossulus* genetic signal in the haemolymph of cancerous *M. edulis* grown in Brittany (Burioli et al., 2019). By comparing two nuclear and two mitochondrial loci from MtrBTN1 tumours, and tumours found in South American *M. chilensis* and European *M. edulis*, Yonemitsu et al. (2019) showed the latter are an independent emergence, called MtrBTN2. One mitochondrial marker indicated that MtrBTN2 from two *M. chilensis* mussels have the *M. chilensis*-derived haplotype, indicating that recombination between host and cancer mitochondria might occur in this cancer lineage (Yonemitsu et al., 2019). Very recently, MtrBTN2 has been observed in *M. trossulus* hosts in the Sea of Japan (Skazina et al., 2021) with divergent mitochondrial DNA (mtDNA) sequences and a lower ploidy (~4N) than the hyperploid MtrBTN2 found in *M. edulis* (>8N, Burioli et al., 2019).

Here, we performed a large genetic screening of European mussels (*M. edulis*, *M. galloprovincialis* and their hybrids) to detect genetic evidence of transmissible cancer (chimerism) of any origin and compare the prevalence between species. For this study we performed a dedicated sampling and also reanalysed data from previous population genetics studies. We finally inferred the genotypes of tumours of the most cancerous individuals and studied polymorphism of these tumours. Most candidate chimeric individuals were subsequently observed via histology, cytology or flow cytometry to obtain a direct validation that the chimerism was the consequence of a transmissible cancer. Because disseminated neoplasia could also be nontransmissible, a subsample of 222 mussels was systematically inspected by histology for the presence of neoplasia before genetic screening. MtrBTN2 was found at a low prevalence in Europe, mostly in *M. edulis* and also in *M. galloprovincialis* and their hybrids. Some neoplastic mussels did not show evidence of genetic chimerism, suggesting that conventional nontransmissible cancers were also present. Finally, the study of MtrBTN2 genotypes from the six most infected *M. edulis* hosts revealed polymorphism and allowed us to describe two divergent sublineages that are cospreading in French populations.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Sampling and genotyping

We analysed a total of 5,907 European mussels (*Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* and some hybrids, subsequently classified with single nucleotide polymorphisms [SNPs], see below), collected between 2005 and 2019 (Figure 1; Table S1). For this study $n = 1,749$ mussels were sampled on two tissues: haemolymph (higher amount of cancer cells, increasing with cancer severity) and mantle (higher amount of host cells, decreasing with cancer severity). We also analysed $n = 4,158$ mussels sampled for population genetics studies at only one tissue (gill or haemolymph). For comparison, we also analysed two known MtrBTN1 samples and their *M. trossulus* hosts (described in Metzger et al., 2016), and 32 healthy *M. trossulus* (10 from British Columbia and 10 from Saint-Laurent, Canada, and eight from the Baltic Sea, Gdansk, Poland) (Table S1).

Solid tissues (mantle and gill) were either fixed in 96% ethanol or directly used for DNA extraction. For haemolymph samples, collected from adductor muscle (1-ml syringe, 26G needle), cells were centrifuged (10 min at 2,500 g) and the supernatant was removed and replaced by 96% ethanol. DNA extraction was done

with the NucleoMag 96 Tissue kit (Macherey-Nagel) in combination with a Kingfisher Flex extraction robot (serial number 711–920; ThermoFisher Scientific). We followed the kit protocol with modified volumes of some reagents: beads 2× diluted in water, 200 µl of MB3 and MB4, 300 µl of MB5 and 100 µl of MB6.

A total of 106 biallelic SNPs described in Simon et al. (2020) were analysed. However, 32 SNPs produced too much missing data and unsatisfactory fluorescence level and were removed from subsequent analyses. The list of 74 nuclear SNPs used and their sequences are provided in Table S2. They were identified to be strongly differentiated between species and lineages of the *M. edulis* complex of species in the study of Fraïsse et al. (2016), in order to develop an ancestry-informative panel of SNPs, and its efficacy was confirmed by the analysis of large data sets (Simon et al., 2020, 2021). Genotyping was subcontracted to LGC Genomics and performed with the KASP method (Cuppen, 2007; Semagn et al., 2014). This method puts two “allele-specific” primers with two different fluorochromes in competition during a PCR (polymerase chain reaction) amplification and gives two values of fluorescence level, one for allele X and the other for allele Y. Homozygous genotypes have a high fluorescence for allele X or allele Y only, while heterozygous genotypes have an intermediate fluorescence for each allele (Figure 2).

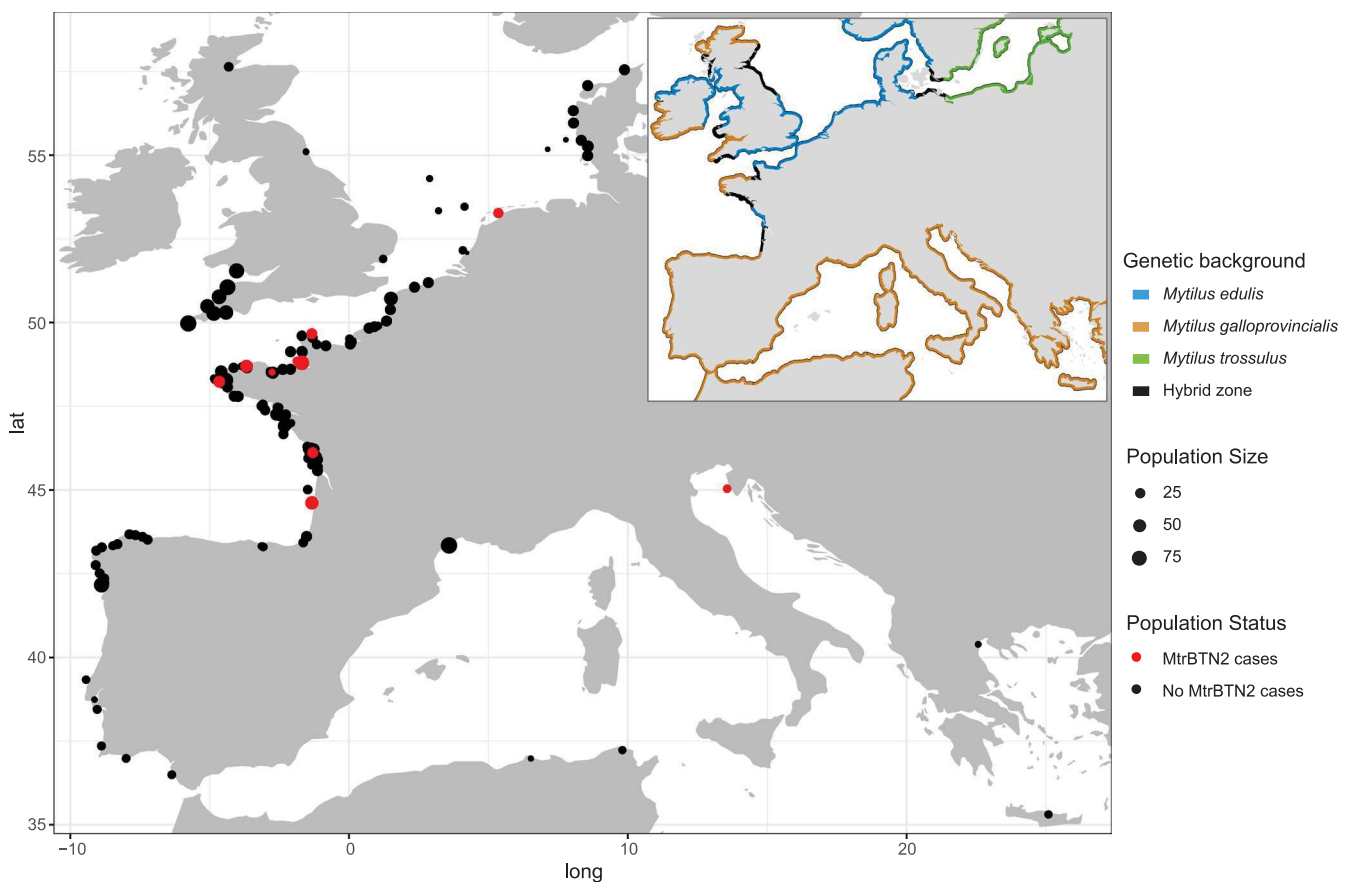


FIGURE 1 Locations of sampling sites and distribution of genetic lineages of *Mytilus* mussels in Europe. Point size indicates sampling size and colour indicates the absence (black) or presence (red) of MtrBTN2 cancer. Coastline colours represent the different genetic lineages: *M. edulis* (blue), *M. galloprovincialis* (orange), *M. trossulus* (green) and hybrid zone (black). All the information about sites is reported in Table S1

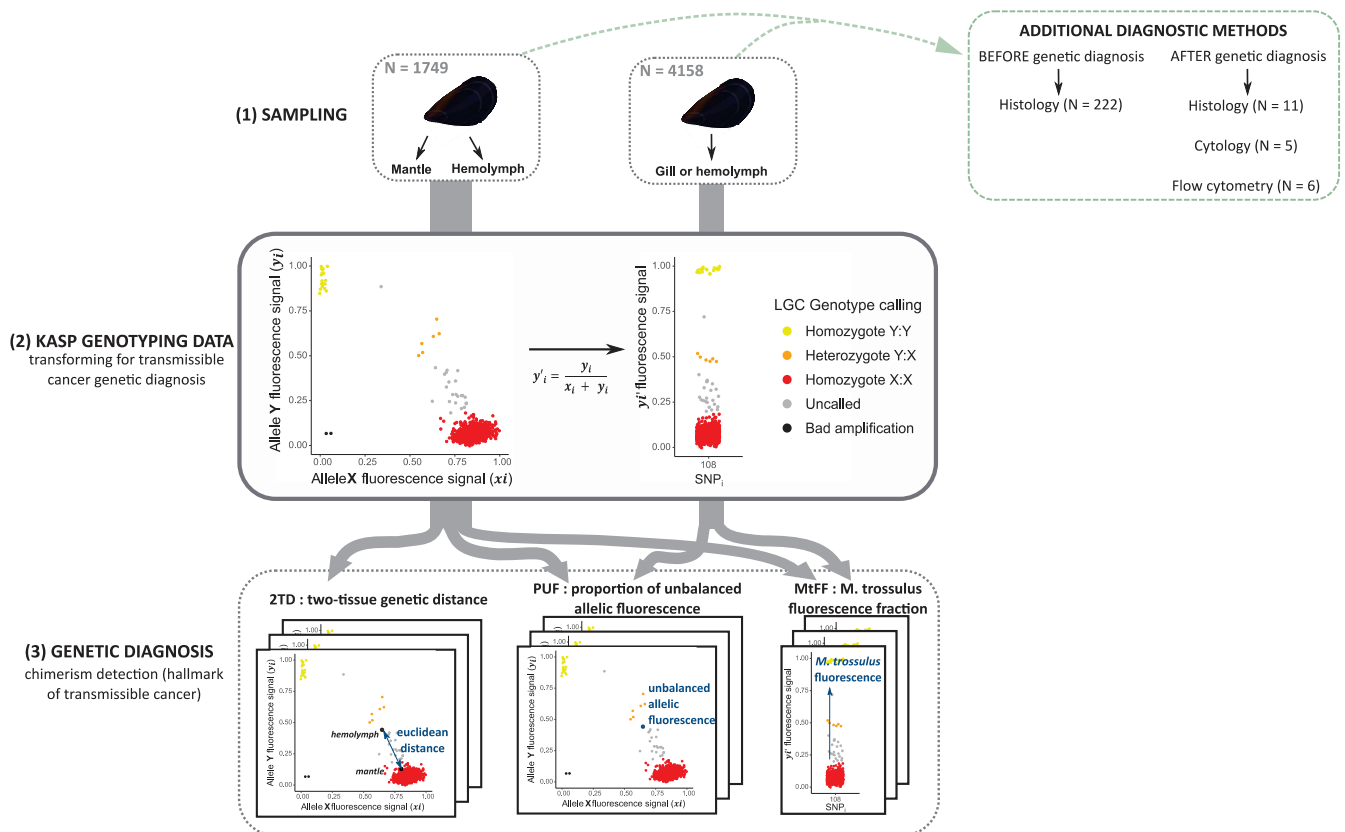


FIGURE 2 Experimental design diagram, from sampling to genetic diagnosis. (1) Mussel sampling; 1,749 individuals double sampled on haemolymph and mantle and 4,158 individuals only sampled on gill or haemolymph. The additional diagnostic methods used are reported in the green box (see Table S3). (2) Transformation of KASP genotyping data for transmissible cancer detection. Example of KASP fluorescence data plot (left) and the transformed fluorescence value y'_i for the bi-allelic SNP “108” (right). This SNP is diagnostic and allele Y (y_i) corresponds to the most frequent allele in *Mytilus trossulus* reference samples (Table S2). Thus, homozygotes X:X (red) are *M. edulis* – *M. galloprovincialis* individuals while homozygotes Y:Y (yellow) are *M. trossulus* individuals. Heterozygotes Y:X (orange) are introgressed genotypes, healthy individuals with a *trossulus*-state allele at a locus due to shared polymorphism. Uncalled (grey) are *M. edulis* – *M. galloprovincialis* hosts with an excess of *M. trossulus* fluorescence probably due to *M. trossulus* transmissible cancer. Poor amplification (black) sequences were removed from the analysis. (3) Genetic diagnosis: three indexes to detect genetic chimerism. Two-tissue genetic distance (2TD) calculated for double sampled mussels ($n = 1,749$). Proportion of unbalanced allelic fluorescence (PUF). *M. trossulus* fluorescence fraction (MtFF) computed from 10 diagnostic SNPs

The genotype classification at each SNP of each sample was determined by two LGC Genomics experts. Assays with too low fluorescence were classified as badly amplified (“bad”) and those with an unbalanced intermediate fluorescence, which were compatible with neither homozygous nor heterozygous genotypes of a standard diploid genotype, were classified as “uncalled” (Figure 2). To assign mussels to species (*M. edulis*, *M. galloprovincialis* or hybrid), we performed a principal component analysis (PCA, *dudi.pca()*, package ADEGENET in R, Jombart & Ahmed, 2011) based on the 74 nuclear SNPs and used the first axis coordinate to infer a hybrid index (Brisbin et al., 2012; Väinölä & Strelkov, 2011).

2.2 | Transforming KASP genotyping data for transmissible cancer genetic diagnostics

In contrast to healthy mussels, mussels affected by transmissible cancer are chimeric, with their infected tissues composed of a mix

of neoplastic and host cells, usually with a proportion deviating from 50:50 (a minority of cancerous cells mainly in the haemolymph at the earlier stages of the disease, and a majority of cancerous cells in every tissue at the later stages but usually with a greater proportion of cancer cells in the haemolymph). As a consequence, the KASP amplification is likely to result in an unbalanced amplification of the two alleles at SNPs for which the genotype is different between cancerous and host cells. Such deviations from standard diploid genotype callings are likely to result in the genotype being classified as “uncalled” (Figure 2). Consequently, we chose to use allele fluorescence values directly rather than genotype calling. To be able to compare samples from independent genotyping experiments, we first had to standardize the X and Y fluorescence values to have all of them in a range from 0 to 1 by using the following formulas within each experimental plate: $x_{ij} = (X_{ij} - \min(X_i)) / (\max(X_i) - \min(X_i))$ and $y_{ij} = (Y_{ij} - \min(Y_i)) / (\max(Y_i) - \min(Y_i))$, where X_{ij} and Y_{ij} are the allele X and allele Y fluorescence values respectively for the i^{th} SNP of the j^{th} sample. Then, following the method of Cuenca et al. (2013) for

genotyping polyploid samples, we transformed the data to obtain a measure of the proportion of allele Y fluorescence at each SNP, with a value ranging from 0 when allele X ($x_{i,j}$) fluorescence dominates, to 1 when allele Y ($y_{i,j}$) fluorescence dominates (Figure 2). Furthermore, SNP alleles were orientated in order for allele Y to be defined as the most frequent in *M. trossulus* and allele X the most frequent in compound *M. edulis* and *M. galloprovincialis* reference samples (see Table S2). To do this, we used allele dosage measured by the following formula: $y'_{i,j} = y_{i,j} / (x_{i,j} + y_{i,j})$ where $y_{i,j}$ and $x_{i,j}$ are the fluorescence values of allele X and Y respectively for the i^{th} SNP of the j^{th} sample (Figure 2). We called $y'_{i,j}$ the “variant allele fluorescence fraction (VAFF)” (analogously to the variant allele fraction statistics used with next-generation sequencing data sets, but with the fluorescence signal used instead of the read coverage).

To filter the data out from poorly amplified low-fluorescence-level SNPs and samples, we calculated an index of amplification following the formula $a_{i,j} = X_{i,j} + Y_{i,j}$, where $X_{i,j}$ and $Y_{i,j}$ are the allele X and allele Y original fluorescence values. Fluorescence levels were removed from the data set when $a_{i,j}$ was below 0.3. Samples with an average index of amplification below 0.8 were also removed.

2.3 | Genetic diagnosis: Three indexes to detect chimerism

We developed two indexes to identify chimeric mussels (a hallmark of transmissible cancer), and a third one designed to specifically identify chimeras with an excess of *M. trossulus* allele fluorescence (Figure 2).

When two tissues of the same individual were sampled we were able to investigate genetic differences between the two tissue samples within individuals. We define the two-tissue genetic distance (2TD) as the Euclidean distance between the haemolymph and the mantle based on allele fluorescences x_i and y_i ($dist()$, package *STATS* in R, R Core Team, 2020) (Figure 2). Chimerism was considered detected when 2TD was above 1.54 (highest percentile, see Results). We expected a higher proportion of cancer cells in the haemolymph than in hard tissues, at least in the early stage of the disease. However, we noticed that for more infected individuals, chimerism was observed in both tissues with sometimes little difference in fluorescence rates between haemolymph and mantle. We therefore developed a second index to identify fluorescence rates that deviate from a balanced amplification of the two alleles. The proportion of unbalanced allelic fluorescence (PUF) was computed as the proportion of SNPs classified as “uncalled” in an individual tissue (classification performed by two LGC experts) (Figure 2). For individuals genotyped at two tissues we obtained two values of PUF, one for each tissue. Chimerism was considered detected when PUF was above 0.20 (highest percentile, see Results), corresponding to a high number of “uncalled” SNPs in a sample. Because only MtrBTN2 has been found in Europe to date (Burioli et al., 2019; Riquet et al., 2017; Yonemitsu et al., 2019) and as MtrBTN2 originated in an *M. trossulus* host, we computed an “*M. trossulus* fluorescence fraction” index (MtFF) to specifically

detect *M. trossulus* chimerism (Figure 2). We selected 10 SNPs of the array that are diagnostic between *M. trossulus* and both *M. edulis* and *M. galloprovincialis* (allele Y fixed or nearly fixed in *M. trossulus* populations and absent or very rare in *M. edulis* and *M. galloprovincialis* populations, see Table S2). We computed the average VAFF (y_{ij}) at these 10 SNPs in order to detect samples with an abnormal excess of *M. trossulus* fluorescence; recall that *M. trossulus* is absent from the areas investigated in this study. As for PUF values, we obtained two values of MtFF for individuals genotyped at two tissues. We considered the *M. trossulus* fluorescence signal as positive when MtFF was above 0.22 (highest percentile, see Results).

Because apparent chimerism can result from experimental artefacts rather than transmissible cancer, we inferred a clustering tree to determine if positive individuals grouped together, as expected for a clonally propagating transmissible cancer, but not for independent contaminations. We used the neighbour-joining method ($nj()$, package *APE* in R, Paradis & Schliep, 2018) based on the Euclidean distance of the VAFF value (y_{ij}).

2.4 | Method evaluation: Analysis of in silico chimeras

We evaluated our ability to detect non-*trossulus* chimerism, and conversely our ability to conclude that neoplasias are nontransmissible, using the 2TD and PUF statistics, by computing the expected distribution of in silico generated chimeras with an increasing fraction of cancer cells in the sample. For the 2TD statistic we first had to estimate the allele fluorescence of chimeras (“chim”). We combined the fluorescence values of two randomly selected haemolymph samples (“host” and “cancer”) following the formula: $x_{i, \text{chim}} = (1 - F)x_{i, \text{host}} + Fx_{i, \text{cancer}}$ and $y_{i, \text{chim}} = (1 - F)y_{i, \text{host}} + Fy_{i, \text{cancer}}$ where x_i and y_i are the allele X and allele Y fluorescence values respectively for the i^{th} SNP of the “host” and “cancer” samples and F is the fraction of cancer cells. Then, we calculated the 2TD as the Euclidean distance between the computed “chimera” haemolymph sample and the “host” mantle sample (as described previously). For the PUF statistic we classified as “uncalled” each SNP for which the “host” and “cancer” haemolymph samples had different genotypes called, and calculated the proportion of “uncalled” SNPs for each chimera (as described previously). Because transmissible cancer can be either intraspecific or interspecific, we generated different categories of in silico chimera by selecting “host” and “cancer” samples from the same or different species (*M. edulis* – *M. edulis*, *M. edulis* – *M. galloprovincialis*, *M. edulis* – *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* – *M. galloprovincialis* and *M. galloprovincialis* – *M. trossulus*).

2.5 | Additional diagnosis methods: Histology, cytology and flow cytometry

A total of $n = 222$ mussels sampled in two tissues were screened for neoplasia using histology (Figure 2; Table S3) before genetic diagnosis.

Shells were opened by cutting the adductor muscle and the soft tissues were removed. An ~5-mm-thick transverse section of mussel tissue containing mantle lobes, visceral mass (gut, digestive gland) and gills was excised, fixed in Davidson's fixative for 48 h and then preserved in 70% ethanol. Fixed tissues were dehydrated through an ascending ethanol series and embedded in paraffin wax. Sections 5 µm thick were produced with a rotary microtome and stained with Harris' haematoxylin and eosin (HHE) (Howard et al., 2004). Histological sections were examined with an Olympus BX50 light microscope. Following a semiquantitative scale previously described (Díaz et al., 2016; Mix, 1983), neoplastic mussels were classified into three severity stages of the disease. These severity stages were "light": a few isolated neoplastic cells in vessels or a single organ; "moderate": a higher number of neoplastic cells in multiple organs; and "heavy": very large number of neoplastic cells in most or all organs.

To validate genetic diagnosis, $n = 17$ mussels were investigated by histology ($n = 11$), cytology ($n = 5$) and/or flow cytometry ($n = 6$) after the genetic screening. The methods used are referenced in Table S3.

2.6 | Real-time PCR to validate MtFF genetic diagnosis

To validate the MtFF genetic diagnosis of $n = 18$ mussels (see Results), we performed the MtrBTN2-specific real-time PCR (Elongation factor locus, EF1 α -H) described in Yonemitsu et al. (2019). Genomic DNA was amplified with a sensiFAST SyBR No-ROX Kit (Bioline) using the primer pair design by Yonemitsu et al. (2019) (forward primer: 5'-GCAAAAGTGGCTGAAAACAGATTCTA, reverse primer: 5'-GTAAAAAAGTTAAAATTTCTTTAGTCACACAA T, amplicon length: 180 bp). Real-time PCR was performed using a LightCycler 480 Real-Time PCR System on three cycling stages (95°C for 15 s, 50°C for 15 s and 60°C for 30 s, respectively) for 40 cycles.

2.7 | Inference of cancer genotypes and their genetic relationship

Determining the genotype of a cancer lineage is complicated by the presence of host cells. However, six samples exhibited an MtFF close to our *M. trossulus* reference samples, consistent with the majority of their cells being cancerous (55% < MtFF < 90%). We used these six samples to infer the genotypes of tumours. To infer genotypes, we used the x/y fluorescence plots as well as the correlation between fluorescence rate at individual SNPs and MtFF values (Figure S1). As we were working with *M. edulis* hosts only (see Results) we used a new *M. trossulus* fluorescence fraction (MtFF2) with an extended number of 17 *M. edulis* - *M. trossulus* diagnostic SNPs (Table S2). MtFF2 was used as a proxy of the proportion of cancerous cells in the sample (see Figure S1). Genotype inference was performed independently by two users and cross-checked.

To have a global comparison of cancerous genotypes with *Mytilus* references, we constructed a maximum-parsimony (MP) tree using

MEGA version 7.0.26 (Kumar et al., 2016) with all sites and the subtree-pruning-regrafting method. SNP genotypes were coded with two nucleotides per position (a single SNP was represented by two positions in a "pseudo-fasta" file) to be able to represent heterozygous and homozygous genotypes and then we combined all SNPs in a single "pseudo-sequence" for each sample before converting to fasta format (*as.fasta()* package BIO3D version 2.4-1 in R, Grant et al., 2006).

2.8 | mtCOI sequences

Individuals STBRI_69, L19_8, L9_3, L11_4 and CamaretB_1 affected by MtrBTN2 were sequenced for a parallel research project and short reads produced by Illumina sequencing were available (Novaseq, paired-end 150 bp). We skimmed mitochondrial reads by mapping them to a set of eight *Mytilus* mitogenomes, using BWA-MEM2 (version 2.0, Md et al., 2019) and SAMTOOLS (version 1.10, Li et al., 2009) with a minimal mapping quality of 5. The mitochondrial genomes from female and male *M. galloprovincialis* (FJ890849 and FJ890850, respectively), *M. edulis* (DQ198231 and AY823623, respectively), *M. trossulus* (AY823625 and HM462081, respectively) and *M. californianus* (JX486124 and JX486123, respectively) were retrieved from GenBank and used as references. Note that the *M. edulis* female mitochondrion is attributed to an *M. trossulus* individual in GenBank but corresponds to an introgression of the *M. edulis* mitochondrion in the Baltic Sea. For each cancerous individual, mitochondrial reads were then assembled with MEGAHIT (version 1.2.9, Li et al., 2016). Contigs produced with MEGAHIT were finally processed with MITOFINDER (Allio et al., 2020) to automatically retrieve contigs corresponding to mitochondria and annotate them (using the invertebrate mitochondrial code as organism type). Then, we extracted cytochrome oxidase I (COI) sequences from all mitochondrial contigs for each individual, and aligned them with sequences of Yonemitsu et al. (2019), Skazina et al. (2021) as well as *M. trossulus* mtCOI sequences gathered from GenBank (Breton et al., 2006; Crego-Prieto et al., 2015; Laakkonen et al., 2021; Layton et al., 2014; Lesser et al., 2010; Marko et al., 2010; Metzger et al., 2016; Zbawicka et al., 2014, see Table S4). We also extracted COI sequences from the mitogenome of Mtx10A, a 100,000-year-old *M. trossulus* mussel (Der Sarkissian et al., 2020, European Nucleotides Archive SAMEA6367443). Finally, we constructed an MP tree using MEGA version 7.0.26 (Kumar et al., 2016) with all sites and the subtree-pruning-regrafting method.

3 | RESULTS

3.1 | Transmissible cancer genetic diagnosis of individuals sampled on two tissues

We first analysed samples of two tissues from $n = 1,749$ mussels in order to evaluate the prevalence of genetic chimerism in this data set and the ability of our indexes to identify mussels infected by a transmissible cancer either of *Mytilus trossulus* origin or other *Mytilus* spp. origins.

We found 11 positive MtFF outlier individuals (*M. trossulus* fluorescence fraction), five for both tissues and six for haemolymph only (Figure 3a; Table S5). Ten of them were also positive at both PUF (proportion of unbalanced allelic fluorescence, five for both tissues and for haemolymph only) and 2TD (2-tissue genetic distance), and the last one was positive at PUF but not 2TD (Figure S2, Table S5). MtFF values were higher in the haemolymph samples than the mantle samples but the difference was sometimes low (Table S5). Those 11 individuals are probably infected by the MtrBTN2 lineage previously described in these populations (Yonemitsu et al., 2019). Ten of these 11 mussels were also investigated by at least one of the additional diagnostic methods (histology, cytology and/or flow cytometry), which confirmed the presence of cancer cells for all of them (Figure 3a, red upward triangle; Table S3). Moreover, the highest MtFF values were found in heavily infected individuals as also reported by Burioli et al. (2019) (Table S3). The individual that was negative at 2TD (L11_4) was equally infected in both tissues. Finally, we used the MtrBTN2-specific real-time PCR diagnosis of Yonemitsu et al. (2019) and found all 11 samples to be positive (Table S6).

We also found 12 individuals that were negative at MtFF but positive at both PUF and 2TD (Figure 3a; Figure S2, see green point, Table S5). Those individuals could be candidates for a new transmissible cancer that emerged in *Mytilus edulis* or *M. galloprovincialis*. We obtained additional diagnostic information (histology, cytology and/or flow cytometry) for nine of these 12 mussels and found no evidence of the presence of cancer cells for eight of them, suggesting the chimerism is not related to transmissible cancer, but probably to experimental artefacts such as contamination (Table S3). Only one individual (CamaretA_61) revealed the possible presence of a few

cancer cells (Figure 3a, green upward triangle; Table S3). Although the haemolymph MtFF of this individual was not high enough to be classed as an outlier, the haemolymph MtFF was nonetheless high, and close to the detection limit (Figure 3a, green upward triangle). This suggests that it could be the *M. trossulus* cancer found in other mussels, probably MtrBTN2, at a very early stage of the disease.

To further investigate the origin of non-*trossulus* chimerism we analysed the genetic similarity of samples with a cluster tree reconstruction based on VAFF Euclidean distances between individuals. All *M. trossulus* chimeric samples grouped together (Figure S3, red points) in a cluster related to *M. trossulus* reference samples. Conversely, non-*trossulus* chimeric samples were sparsely distributed across the tree. Two exceptions, CamaretA_61 and AUN_001_13, were the two samples with the haemolymph MtFF close to the detection limit (and with few cancer cells for CamaretA_61), which cluster with the *M. trossulus* chimeric group. This suggests again that they represent the early stages of the MtrBTN2 disease. Although two other groups (of four and two samples, respectively) tended to cluster together, they were respectively sampled in a population with sympatric *M. edulis* and *M. galloprovincialis*, and a contamination can easily resemble a hybrid genotype. Note that the three non-*trossulus* chimeric individuals (AUN_001_13, Plg3 and L1_29) for which no additional method diagnosis information was available do not cluster together in the tree (Figure S3). However, lack of clustering among the non-*trossulus* chimeric samples should not be overinterpreted, because the fluorescence signal of non-*trossulus* BTN cells might be insufficient to dominate the signal of host cells. In that case, however, PUF and 2TD statistics would not be expected to be outlying. Our analysis of *in silico* chimeras with variable proportions of

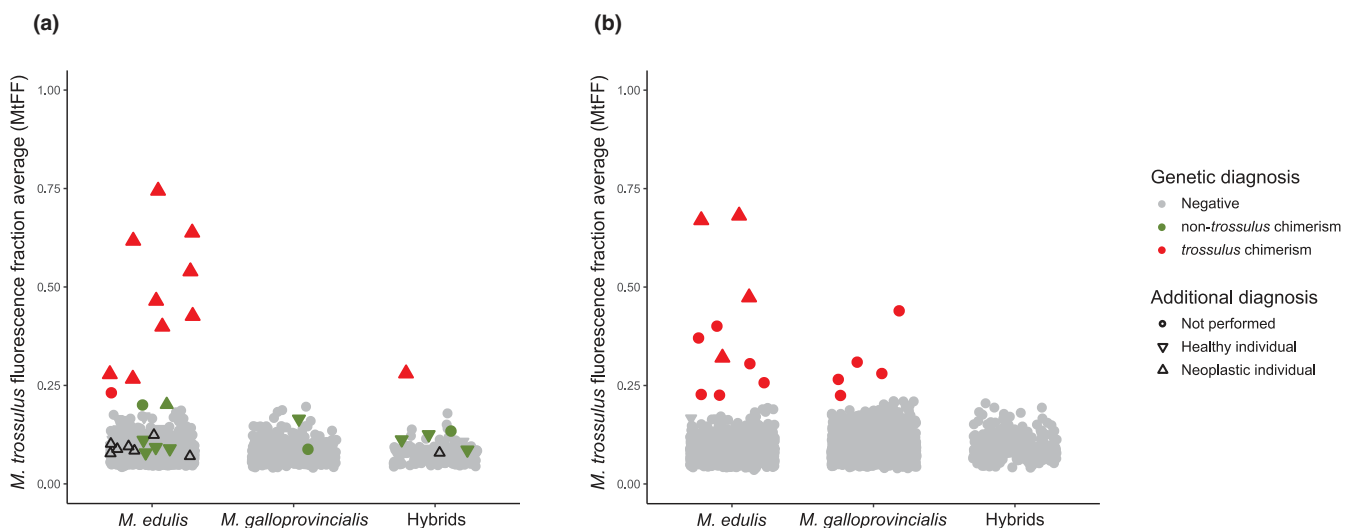


FIGURE 3 *Mytilus trossulus* fluorescence fraction (MtFF) used for genetic diagnosis. (a) MtFF values for individuals sampled at two tissues. Colour corresponds to genetic diagnosis: red for *trossulus* chimeric individuals (positive for MtFF, PUF and 2TD), green for non-*trossulus* chimeric individuals (positive for PUF and 2TD indexes) and grey for nonchimeric individuals (negative for all indexes). Black upward triangles represent neoplastic individuals of type B which are not chimeric (negative for all indexes). (b) Single-sampled individuals for which genetic diagnosis corresponds to the MtFF value: red for *trossulus* chimerism (positive to MtFF) and grey for nonchimeric individuals (negative to MtFF). (a,b) The symbol form corresponds to additional diagnosis methods (histology, cytology or flow cytometry): upward triangles for neoplastic individuals, downward triangles for healthy individuals and dot for not performed (see Table S3)

mixing between two individuals (Figure S4) allows us to estimation the level of infection needed to detect a BTN (over 80% for an *M. edulis* BTN in *M. edulis* host, over 50% for an *M. galloprovincialis* BTN in *M. galloprovincialis* host and over 30% for an interspecific spreading). With such proportions of cancer cells, chimeric samples would have tended to cluster together, as illustrated by examples of *in silico* chimera with mixtures of 40%, 60% and 80% added in the tree (see Figure S3, orange branches). Above all, we would have observed neoplastic cells by histological examination. Taking this evidence together, we conclude that non-*trossulus* chimerism was probably due to technical artefacts.

3.2 | Screening of MtrBTN2 in individuals sampled on one tissue only

Having shown that the *M. trossulus* fluorescence fraction (MtFF) provided a satisfactory diagnostic for MtrBTN2, even with mantle samples, and having found very little evidence for other transmissible cancers, we decided to analyse previously obtained genotyping data from DNA extraction of gills ($n = 3,988$) and haemolymph ($n = 197$). This allowed us to substantially increase our sample size from 1,749 to 5,907 mussels. The MtFF index allowed us to identify 15 individuals with an excess of *M. trossulus* fluorescence (Figure 3b, red point; Table S5). Chimerism was confirmed by a high PUF signal for 12 of them (Figure S2, Table S5). The three others had a very low PUF and correspond to MtFF values close to the detection limit. We considered as candidates only the 12 positives for both MtFF and PUF. In addition, we had additional diagnostic information for four of them, which all proved to be infected by neoplastic cells (Figure 3b, red upward triangle; Table S3). Finally, for six of those samples we performed the MtrBTN2-specific real-time PCR diagnosis of Yonemitsu et al. (2019) and found all six to be positive (Table S6).

3.3 | Host-specific prevalence of MtrBTN2 in Europe

We classified individual mussels as *M. edulis*, *M. galloprovincialis* or hybrid using a PCA on all SNP VAFF values (y_{ij}^v). The first axis of the PCA separates *M. edulis* and *M. galloprovincialis* individuals, with hybrids in between, while the second axis separates these two species and *M. trossulus* (Figure S5). We used the first axis coordinate to infer a hybrid index (HI: Brisbin et al., 2012; Väinölä & Strelkov, 2011) and assign mussels to *M. edulis* (HI >0.85), *M. galloprovincialis* (HI <0.4) and hybrids (0.4 < HI <0.85). These values were chosen because asymmetric introgression generates a larger variance of *M. edulis* ancestry in *M. galloprovincialis* than vice versa. The overall prevalence of MtrBTN2 was low (25/5,907 = 0.42%) but was significantly higher in *M. edulis* hosts (22/2808 = 0.78%) than in hybrids and *M. galloprovincialis* hosts (1/381 = 0.26% and 2/2718 = 0.07%, respectively; Fisher's exact test $p = .0002$).

3.4 | Nontransmissible cancers

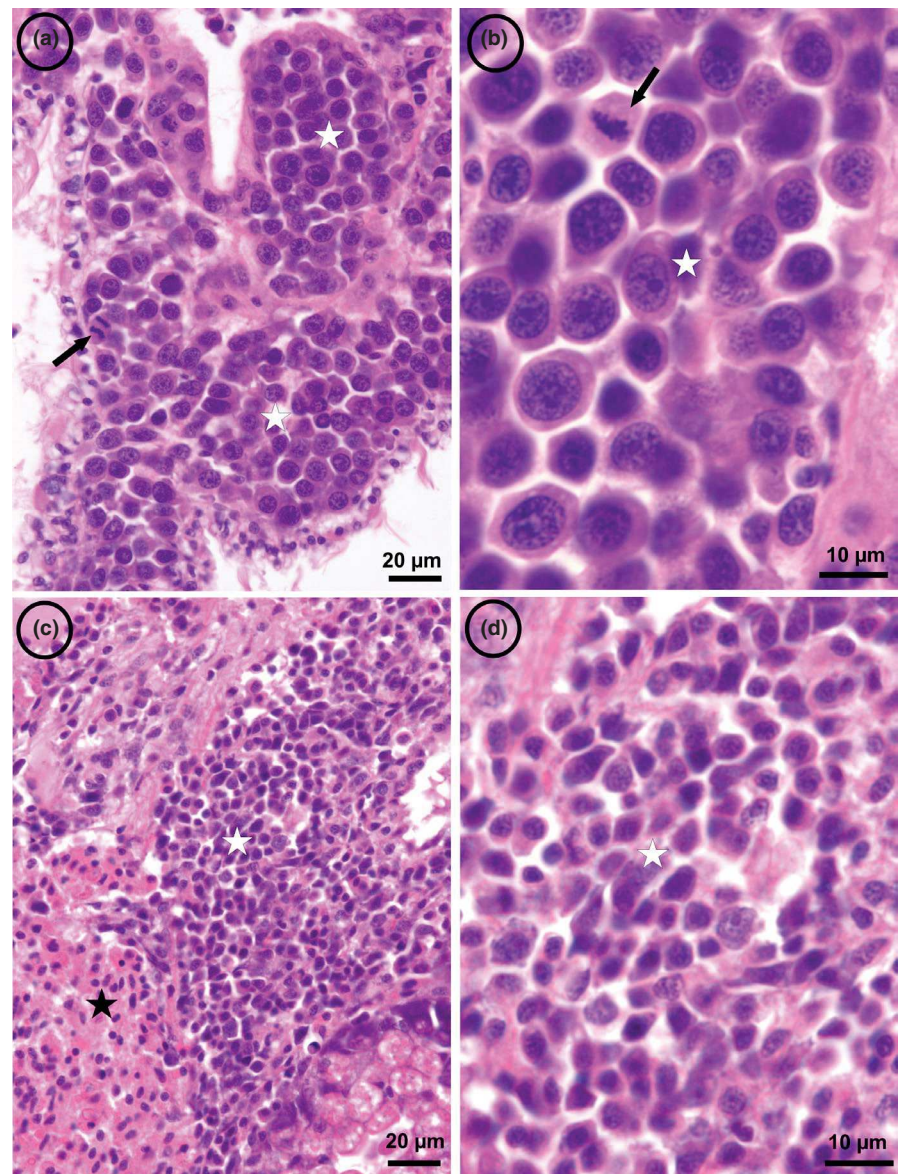
For 222 individuals we conducted histological inspection before genetic diagnosis. One individual, L9_3, was highly infected by large neoplastic cells referred to as type A neoplasia (see Figure 4a,b and description below). This individual was positive at the three genetic diagnostics indexes (MtFF, PUF and 2TD) and was infected by MtrBTN2. Eight individuals from batch L6 were affected by a type of neoplasia characterized by neoplastic cells with smaller size than the type A and referred as type B neoplasia (see Figure 4c,d). Both disseminated neoplasia type A and type B involved the proliferation of abnormally large cells through the connective tissue and haemolymph vessels of different organs. When examining histological sections, the main morphological character for discrimination between neoplasia types was the nuclear size, which was significantly larger in type A (mean diameter $\pm SE = 7.83 \pm 0.136 \mu\text{m}$; range: 6.0–9.9 μm ; $N = 31$) than in type B (mean diameter $\pm SE = 4.56 \pm 0.096 \mu\text{m}$; range: 3.6–5.1 μm ; $N = 40$); both cell types showed scant cytoplasm (high N/C ratio) and mitotic figures were more abundant in type A. Genetic analysis revealed no evidence of chimerism for these individuals with neoplasia type B (low values of PUF and 2TD, Figure S2, Table S5). Note that the highest PUF and 2TD values corresponded to two different samples (L6_49 for PUF and L6_46 for 2TD). However, our analysis of *in silico* chimeras with variable proportions of mixing between two individuals (Figure S4) suggested that a BTN from an *M. edulis* founder infecting an *M. edulis* host can be missed if the neoplastic cells do not outnumber normal cells. It is therefore possible that the proportion of neoplastic cells could have been too low in each individual. We used our *in silico* chimera to test the proportion of neoplastic cells needed to detect chimerism with 2TD when we combine the eight samples with a Fisher's combined probability test. More than 35% neoplastic cells in each sample would be needed to obtain a significant test. Given that almost all mussels infected were in the moderate or heavy stages of the diseases (see Table S3), the most parsimonious interpretation is that type B disseminated neoplasias are not transmissible.

3.5 | Genotypic differences and polymorphism of MtrBTN2 tumours

Cancerous samples were a mix of host and tumour genotypes and when the proportion of cancer cells was too low we could not infer the tumour genotype accurately. Hence, we inferred the tumour genotype of six cancerous individuals with the highest MtFF2 values (>0.75) and composed of a vast majority of cancer cells (up to 90%, Figure S1 and Table S7). Most of the SNPs were associated with *M. trossulus*-state alleles (Figure 5c; Figure S6, see "fixed between lineages"), as expected for an emergence in an *M. trossulus* host.

Using the 74 nuclear SNPs, we then reconstructed an MP tree with *M. edulis* and *M. trossulus* healthy individuals, two MtrBTN1 and six MtrBTN2 (Figure 5a). As expected, *M. edulis* and *M. trossulus* form two genetically distinct clusters. MtrBTN2 samples group together

FIGURE 4 Light micrographs of histological sections through the visceral mass of two mussels, one affected by disseminated neoplasia type A (a,b) and the other by disseminated neoplasia type B (c,d). The arrows point to mitotic figures; white stars mark masses of neoplastic cells; and the black star marks a mass of normal haemocytes



and differ from MtrBTN1, confirming the existence of two distinct lineages (Yonemitsu et al., 2019). The two *Mytilus* BTN lineages are related to the *M. trossulus* cluster, also confirming the *M. trossulus* origin of both.

Even though MtrBTN2 tumours group together, many genetic differences (polymorphisms) were observed among the six tumours. Closer inspection of the subtree with only the six tumours (Figure 5b) shows two groups of tumours: L11_4, Pal30 and STBRI69 (sublineage a) on one side and L19_8, L9_3 and CamaretB_1 (sublineage b) on the other side, separated by as many as eight mutations (10% of SNPs, Figure 5c, see “Polymorphic between sublineages”). Sublineage a is homozygous for seven of these eight mutations (mostly *M. trossulus*-state alleles) while sublineage b appears heterozygous. The 12 mutations found in each sublineage can be orientated by parsimony. Surprisingly, 10 of those 12 mutations (see polymorphic SNPs on the right of Figure 5c) are gains of heterozygosity (GOH, Figure 5b, black arrow) while only two are losses of heterozygosity (LOH, Figure 5b, colored arrow). However, the eight mutations separating the two

sublineages cannot be orientated without rooting the tree, which is not possible given that the host is sexually reproducing. However, we can work on alternative hypotheses given that the SNPs are diagnostics between *M. trossulus* and *M. edulis*. Under a “nonhybrid founder” hypothesis (Figure 5b, see H1) the ancestor would have been homozygous for *M. trossulus*-state alleles and we could infer excess GOH in sublineage b. Under a “hybrid founder” hypothesis (Figure 5b, see H2) the ancestor would have been heterozygous and we could infer an excess LOH toward the *M. trossulus*-state in sublineage a.

The mtCOI tree (Figure 6) mostly confirms the nuclear tree and sublineages with the exception of the L9_3 mtCOI sequence, which appears divergent to every other MtrBTN2 sequence sampled in *M. edulis* or *M. chilensis*, while this tumour is related to L19_8 and CamaretB_1 in the nuclear tree. Together with the MtrBTN2 sequences obtained from *M. trossulus* (Skazina et al., 2021), the L9_3 mtCOI sequence suggests 62mc10 mitochondria came from an MtrBTN2 tumour, as extensively discussed by Skazina et al. (2021).

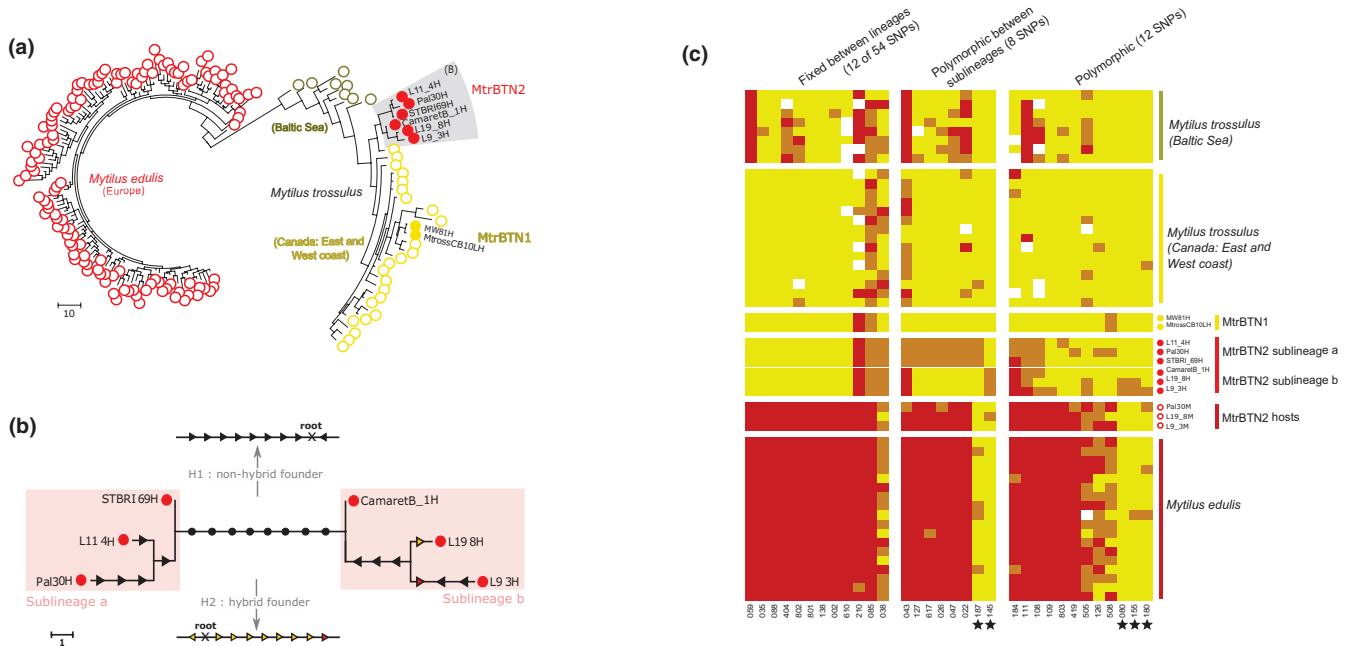


FIGURE 5 MtrBTN2 tumour genotypes. (a) Maximum parsimony tree estimated from 74 nuclear SNP genotypes of MtrBTN2 tumours (red filled circles), *Mytilus edulis* individuals (red open circles), MtrBTN1 tumours (yellow filled circles), and *M. trossulus* individuals from British Columbia (yellow open circles) and the Baltic Sea (dark yellow open circles). (b) Unrooted subtree of the six MtrBTN2 tumours. Mutations are reported and represent gain of heterozygosity (black arrow), loss of heterozygosity (coloured arrow, yellow for mutation toward a *trossulus*-state allele and red toward an *edulis*-state allele). The founder (common ancestor) genotype being unknown, the eight mutations separating the two lines (black circles) cannot be orientated without assumptions. We present two hypotheses: a nonhybrid founder (H1, all mutations are gain of heterozygosity) and a hybrid founder (H2, all mutations are loss of heterozygosity but mostly to a *trossulus*-state allele). (c) Plot of genotypes for a subset of SNPs in columns and individuals in rows. Red: homozygote of *edulis*-state allele; yellow: homozygote of *trossulus*-state allele; orange: heterozygote. Individuals' origins are reported by circle type and colour (see panel a) and only 17 of the *M. edulis* individuals are represented here. The first two columns correspond to mitochondrial SNPs, the 12 next to a subset of nuclear SNPs fixed in the six MtrBTN2 tumours, then eight SNPs fixed between the two sublineages and then 12 SNPs revealing polymorphism within each sublineage. Red arrowhead points to the five SNPs with an *M. edulis*-state allele excess in the six tumours. Black star highlights the five SNPs for which *M. edulis*-state alleles in tumours are not explained by the null allele hypothesis. All individuals and SNPs are detailed in Figure S5

Briefly, this sequence has been obtained after an extensive screening of *M. trossulus* mitochondria in Baltic mussels known to be fixed for introgressed *M. edulis* mitochondria, and 62mc10 was found to be heteroplasmic for two F mitochondria (Śmietanka & Burzyński, 2017). The Bf-48 haplotype that clusters with J54-1 and J161-1, as well as the SA1 and SA5 haplotypes that cluster with J111-2 and J181-2, could also be MtrBTN2 tumours, as discussed by Skazina et al. (2021). The closest mtCOI sequences of healthy mussels were obtained from populations of the Northwest Pacific, and Northwest and Northeast Atlantic but none from populations of the Northeast Pacific, as previously discussed by Skazina et al. (2021). In principle, molecular clock calibration using the 100,000-year-old Tx101A sequence (Der Sarkissian et al., 2020) would have allowed us to date the most recent common ancestor (MRCA) of every MtrBTN2. However, the closest haplotypes have no substitutions from the ancestral node and four haplotypes only one or two substitutions (Figure 6B), and the MtrBTN2 clade appears to have much longer branches, suggesting an accelerated evolutionary rate that prevents accurate dating of the MRCA.

4 | DISCUSSION

We investigated the presence of transmissible cancer in samples of European *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* mussels and their hybrids. We used SNP KASP genotyping to screen a large number of mussels in order to detect transmissible cancers and at the same time studied the genotypes of the infected hosts and their tumours. We detected MtrBTN2, a previously described transmissible cancer that originated in an *M. trossulus* host, but no other transmissible cancers were found in the inspected area with our screening approach. MtrBTN2 is known to affect *M. edulis* (Burioli et al., 2019; Riquet et al., 2017), *M. chilensis* (Yonemitsu et al., 2019) and *M. trossulus* (Skazina et al., 2021) but we also found cases in *M. galloprovincialis* and hybrid individuals, thus extending the known spreading capacity of MtrBTN2 to an additional species of the complex. Despite an overall low prevalence (0.42%), it appeared more prevalent in *M. edulis* hosts (0.78%) than *M. galloprovincialis* (0.07%) and hybrid (0.26%) hosts. We also found neoplastic mussels without evidence of genetic chimerism, suggesting the presence of conventional nontransmissible

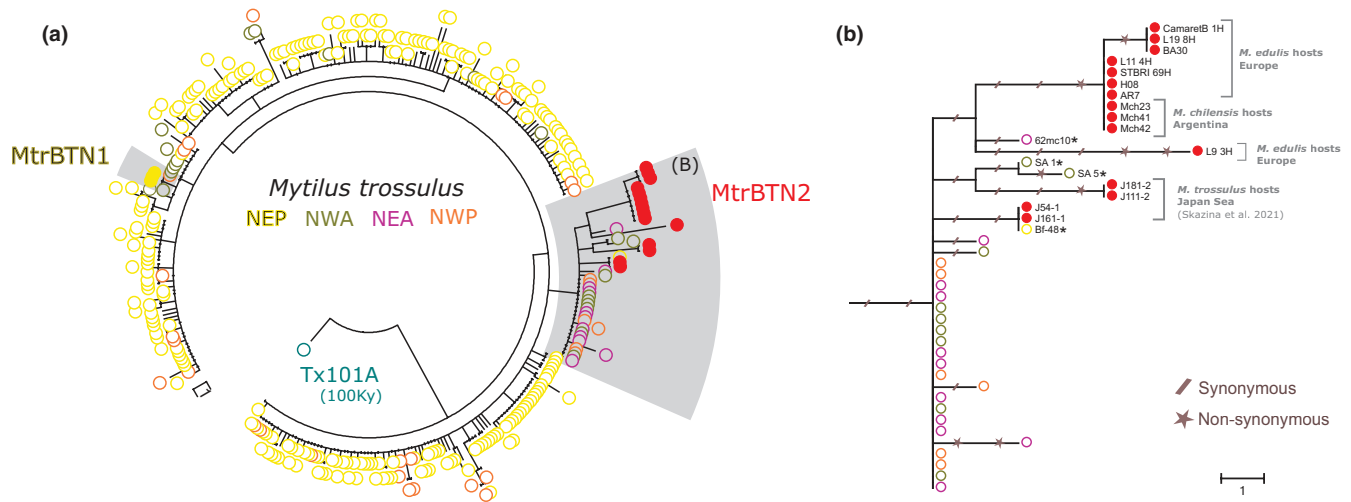


FIGURE 6 Phylogenetic analysis of mtCOI sequences. (a) Maximum parsimony tree on mtCOI 603-bp aligned sequences of our five MtrBTN2 tumour samples (red filled circles, L9_3, CamaretB_1, L19_8, L11_4, STBRI69) and all available *Mytilus trossulus* (GenBank) including three MtrBTN1 tumour samples (yellow filled circles), seven MtrBTN2 tumour samples of which four are from *M. trossulus* hosts (Skazina et al., 2021) and three are from *M. chilensis* hosts (red filled circles), and a 100,000-year-old (Tx101A, blue open circles) and contemporary *M. trossulus* mussels (see mec16052-sup-0001-SupInfo.xlsx). (b) Subtree of MtrBTN2 mtCOI haplotypes with the two closest relatives from healthy mussels. Synonymous and nonsynonymous mutations are reported with slashed traits and stars respectively. Host species and geographical origins are indicated on the right side of the tree

cancers. The analysis of the genotypes of six tumours from *M. edulis* hosts confirmed the *M. trossulus* origin of MtrBTN2. We surprisingly observed a high amount of nuclear and mitochondrial polymorphism in MtrBTN2 samples. This polymorphism defines two sublineages that coexist and spread in the same populations, as has been observed in other transmissible cancers (CTVT: Baez-Ortega et al., 2019, DFTD: Kwon et al., 2020; Patton et al., 2020).

The MtrBTN2 prevalences found in our study were consistent with DN prevalences previously reported in *M. edulis* (around 1%, for a review see Carballal et al., 2015; Muttray & Vassilenko, 2018) and *M. galloprovincialis* mussels (rarer and when detected <1%, for a review see Carballal et al., 2015; Matozzo et al., 2018), but slightly lower than the prevalence of *M. trossulus* BTN found in Brittany (3.4%, Burioli et al., 2019). It is likely that we missed the very early stages of the disease. Indeed, MtFF estimates the excess of *M. trossulus* allele fluorescence and when the proportion of cancer cells is too low, the host genotype dominates the signal. The two other indexes we used (PUF and 2TD) did not help us to find additional tumours, with the exception of one sample (CamaretA_61) that was infected by a few neoplastic cells and showed an MtFF value at the limit of the outlier threshold (Figure 4a, green upward triangle). Although the prevalence of MtrBTN2 could have been slightly underestimated, the detection limit of MtrBTN2 is expected to be similar for *M. edulis*, *M. galloprovincialis* and their hybrids.

The higher prevalence in *M. edulis* than *M. galloprovincialis* and their hybrids in between could reflect a lower sensitivity (higher efficient immune response) of *M. galloprovincialis* to MtrBTN2. Indeed, Fuentes et al. (2002) found a higher DN prevalence in hybrid laboratory crosses (*edulis* × *galloprovincialis*) than *M. galloprovincialis* crosses (*galloprovincialis* × *galloprovincialis*), but unfortunately no *M.*

edulis laboratory crosses (*edulis* × *edulis*) were reported. Moreover, it has been shown that *M. galloprovincialis* is less affected by pea crab and bucephalid trematode parasitism than *M. edulis* living in the same region (Coustau et al., 1991; Seed, 1969). Also, a study of mussel haemocyte transcriptomes showed higher sequence numbers related to immune genes in *M. galloprovincialis* compared to *M. edulis* after in vitro and in vivo stimulation with pathogen-associated molecular patterns and heat-inactivated *Vibrio anguillarum*, respectively (Moreira et al., 2018). Beyond that, *M. galloprovincialis* is a worldwide invader (Popovic et al., 2020) with a fitness advantage in natural hybrid zones (Coustau et al., 1991; Hilbish et al., 1994; Skibinski et al., 1983; reviewed in Gardner, 1994) and in laboratory crosses (Bierne et al., 2006) which, in different ways, appear to be more efficient than *M. edulis*.

Given that the existence of conventional cancers is a prerequisite for transmissible cancer to evolve in the initial founder host, the observation of eight nontransmissible neoplasia was not unexpected. Cases of conventional nontransmissible cancer have also been described in Chile where two tumours without transmissible cancer hallmarks were found in the same area as two MtrBTN2 tumours (Yonemitsu et al., 2019). The eight tumours (type B, see Figure 4c,d) were collected on the same date (April 2017), in the Bay of Brest, where levels of lead (Pb) were found above the regulatory threshold for human food (Charles et al., 2020). Environmental contaminants have previously been proposed as an aetiological cause of DN (Hillman, 1993; Lowe & Moore, 1978), such as biotoxins (Landsberg, 1996) and viral factors (Elston et al., 1988; Moore et al., 1991; Rasmussen, 1986), which could be involved in the high prevalence of type B diseased individuals in this specific area and on that date. However, we also sampled mussels from the Bay of Brest in February,

when Pb levels were also high (Charles et al., 2020), but no type B cancerous mussels were found. The coexistence of a transmissible cancer with nontransmissible cancers calls for the systematic use of molecular markers to verify the transmissible nature of DN. More generally, wildlife cancer research needs to consider more general use of molecular markers (Leathlobhair et al., 2017).

Polymorphism in transmissible cancer at SNPs ascertained in host populations can suggest multiple emergences, or a single emergence with somatic back mutations (point or structural mutations) or a deviation from clonal propagation (horizontal gene transfer, cell fusion, parasexual recombination, etc.). Comparison of our mtCOI tumour sequences with published MtrBTN2 mtCOI sequences (Skazina et al., 2021; Yonemitsu et al., 2019), and the grouping of the tumours with 54 fixed SNPs, suggests a single emergence is the most parsimonious interpretation. However, we have to assume that some published mtCOI sequences have been obtained from uncharacterized cancerous mussels, as argued by Skazina et al. (2021). This is likely for 62mc10 given how it has been obtained in a heteroplasmic mussel after extensive screening for recombinant mitogenomes (Śmietanka & Burzyński, 2017), but only based on phylogenetic proximity for Bf-48, SA1 and SA5 (Figure 6b). Indeed, the study of Riquet et al. (2017) suggests cancer genetic signals exist in the standard population genetics literature of mussels. Thus, we cannot rigorously reject the hypothesis of a twin coemergence in an ancestral (or contemporary unsampled) *M. trossulus* population with a different genetic composition than sampled *M. trossulus* populations. The recent independent emergence of two transmissible facial-tumour lineages (DFTD1 and DFTD2) in Tasmanian devils suggests that when favourable conditions are met, multiple emergences can succeed in a very short time period (Ujvari et al., 2016). Interestingly, we found *M. edulis*-state alleles on some SNPs, which could suggest an ancient origin, in an *M. trossulus* population which was less divergent than the actual population, or an origin in a recombinant hybrid between *M. trossulus* and *M. edulis* (Figure 5b, H1 and H2). However, it is also likely that somatic null alleles caused by structural variations or point mutations in primer-binding sites lead to enhanced detection of the host alleles at these SNPs.

Given that we analysed only 74 nucleotide positions and we observed polymorphisms at 20 SNPs (27%), we believe polymorphism observed among tumours is unlikely to be due to homoplasic point back mutations at the SNP site. Such a high rate of homoplasic back substitutions would correspond to a very old divergence that is not supported by mtCOI divergence (Figure 6) and EF α gene divergence (Skazina et al., 2021; Yonemitsu et al., 2019). The polymorphisms are more probably due to mutations in primer-binding sites or structural variations, such as insertion-deletion and chromosomal losses or gains, or recombination leading to loss of heterozygosity, that are widespread in cancer (McClelland, 2017; Nichols et al., 2020) and have been reported in other transmissible cancers (e.g., in DFT1 and DFT2, Kwon et al., 2020). According to the genotyping method used (competition of the two allele fluorescences), partial or complete chromosomal losses or gains result in a modification of the ratio of fluorescences of the two alleles of hyperploid MtrBTN2 tumours

and of the ratio of tumour and host genotypes. We observed that most somatic variations that could be orientated resulted in GOH rather than LOH (10 gains mostly of *M. edulis*-allele state, two losses), supporting the hypothesis that the variation is due to somatic null alleles leading to enhanced detection of the host *M. edulis* alleles. The same hypothesis would also explain the divergence between the two sublineages (H1 in Figure 5b). Another, although maybe less likely, hypothesis could be horizontal gene transfer from host to tumours. This hypothesis would be supported by five SNPs for which the host allele state does not explain the heterozygous state of tumours (Figure 5c, black star). The same hypothesis would also explain the divergence between the two sublineages under the hypothesis of a hybrid founder genotype (H2 in Figure 5b). Indeed, spontaneous fusion between tumour and host cells (reviewed in Noubissi & Ogle, 2016) or between tumour cells (Amend et al., 2019; Pienta et al., 2020) has been shown to result in tumour heterogeneity, which increases invasion, migratory capacities and resistance to therapies. Recombination can also occur after cancer cell fusion (Miroshnychenko et al., 2021). Fusion between two BTN lineages or between BTN and conventional cancers could explain hyperploidy and the variable VAFF value observed. We also note that heterozygous-like SNPs, with an intermediate dosage of the two alleles, and homozygotes for the *M. edulis*-state allele, do not show evidence of a decreased fluorescence signal as it could have been expected under the null allele hypothesis (Figure S7). However, in the absence of further convincing evidence, we suggest that somatic null alleles and mutations remain the most parsimonious explanation to the diversity observed.

Finally, one of the six tumours, L9_3, had a divergent mtCOI sequence to the other MtrBTN2 mtCOI sequences sampled in *M. edulis* and *M. chilensis* hosts (Figure 6). The mismatch between the nuclear and the mitochondrial trees suggests the existence of mitochondrial capture or recombination events in MtrBTN2. This phenomenon has been described several times in CTVT where mitogenomes reveal multiple independent horizontal transfers of mitochondria from hosts (Strakova et al., 2016, 2020). In addition, recombinant mitochondria have been observed in two MtrBTN2 tumours from Chile (Yonemitsu et al., 2019). Here, however, the capture/recombination would have happened from another MtrBTN2 tumour, possibly by cellular fusion as explained above. Mitochondrial capture could also be an explanation for the phylogenetic positions of published mtCOI haplotypes that cluster with MtrBTN2 haplotypes while being sampled from mussels that were not characterized for DN and assumed to be healthy (Bf-48, SA1 and SA5 in Figure 6b). Under this hypothesis these captures would involve related mitochondria and would have probably happened early during the diversification of MtrBTN2 in the ancestral population.

5 | CONCLUSION

Our study has revealed that MtrBTN2, a bivalve transmissible neoplasia that originated in a *Mytilus trossulus* host, affects European *M.*

edulis at a low prevalence and also affects *M. galloprovincialis* and hybrids although at a much lower rate. No other transmissible cancer has been identified with our approach, but conventional nontransmissible cancers have been observed, which suggests that molecular markers should be used to diagnose the transmissible status of disseminated neoplasia. Somewhat surprisingly we found polymorphism among MtrBTN2 tumours, probably due to somatic structural variation leading to null alleles. The origin of this polymorphism will need to be further investigated with alternative sequencing methods. The coexistence of sublineages in the same geographical region suggests a history of MtrBTN2 diversification with a complex biogeography, as has also been reported in CTVT and DFTD (Baez-Ortega et al., 2019; Kwon et al., 2020; Patton et al., 2020).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Montpellier Université d'Excellence (BLUECANCER project), Agence Nationale de la Recherche (TRANSCAN project, ANR-18-CE35-0009), the French DPMA (Direction des pêches maritimes et de l'aquaculture, DPMA-2017-MORBLEU Conventions No.: 16/1212569 & 17/1212952) and Conseil Régional de Normandie, LabEx CeMED (Junior Research Team funding).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.H., A.S., M.J.M. and N.B. designed the project. All authors contributed to sampling, sample preparation and data curation. M.H., A.S. and C.A. conducted the molecular work with guidance from G.C., D.D.-G. and N.B., and A.V., E.A.V.B. and A.B. performed histology, cytology and flow cytometry. M.H., A.S., J.J.W. and N.B. analysed the data. M.H. and N.B. wrote the initial manuscript. All authors contributed insights about interpretation of the results, and critically reviewed and edited the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Original genotype data from LGC (fluorescence coordinate and calling) and VAFF are available on Dryad (<https://doi.org/10.5061/dryad.sj3tx9652>). Accession numbers of sequences used in Figure 6 are available in Table S4. More generally, all data generated by this study are available in Supplementary Information Tables.

ORCID

Maurine Hammel  <https://orcid.org/0000-0001-9937-5678>

Alexis Simon  <https://orcid.org/0000-0002-6176-5045>

Erika A. V. Burioli  <https://orcid.org/0000-0003-2666-9258>

Jean-François Pépin  <https://orcid.org/0000-0001-8548-8938>

Jean-Baptiste Lamy  <https://orcid.org/0000-0002-6078-0905>

Ismael Bernard  <https://orcid.org/0000-0002-3666-7419>

Guillaume M. Charrière  <https://orcid.org/0000-0002-4796-1488>

Delphine Destoumieux-Garzon  <https://orcid.org/0000-0002-8793-9138>

<https://orcid.org/0000-0002-8793-9138>

Nicolas Bierne  <https://orcid.org/0000-0003-1856-3197>

REFERENCES

- Allio, R., Schomaker-Bastos, A., Romiguier, J., Prosdoci, F., Nabholz, B., & Delsuc, F. (2020). MitoFinder: Efficient automated large-scale extraction of mitogenomic data in target enrichment phylogenomics. *Molecular Ecology Resources*, 20(4), 892–905. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13160>
- Amend, S. R., Torga, G., Lin, K. C., Kostecka, L. G., de Marzo, A., Austin, R. H., & Pienta, K. J. (2019). Polyploid giant cancer cells: Unrecognized actuators of tumorigenesis, metastasis, and resistance. *The Prostate*, 79(13), 1489–1497. <https://doi.org/10.1002/pros.23877>
- Baez-Ortega, A., Gori, K., Strakova, A., Allen, J. L., Allum, K. M., Bansa-Issa, L., Bhutia, T. N., Bisson, J. L., Briceño, C., Castillo Domracheva, A., Corrigan, A. M., Cran, H. R., Crawford, J. T., Davis, E., de Castro, K. F., B. de Nardi, A., de Vos, A. P., Delgadillo Keenan, L., Donelan, E. M., ... Murchison, E. P. (2019). Somatic evolution and global expansion of an ancient transmissible cancer lineage. *Science*, 365(6452), eaau9923. <https://doi.org/10.1126/science.aau9923>
- Benabdelmouna, A., & Ledu, C. (2016). The mass mortality of blue mussels (*Mytilus* spp.) from the Atlantic coast of France is associated with heavy genomic abnormalities as evidenced by flow cytometry. *Journal of Invertebrate Pathology*, 138, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.06.001>
- Benabdelmouna, A., Saunier, A., Ledu, C., Travers, M. A., & Morga, B. (2018). Genomic abnormalities affecting mussels (*Mytilus edulis-galloprovincialis*) in France are related to ongoing neoplastic processes, evidenced by dual flow cytometry and cell monolayer analyses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 157, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.08.003>
- Bierne, N., Bonhomme, F., Boudry, P., Szulkin, M., & David, P. (2006). Fitness landscapes support the dominance theory of post-zygotic isolation in the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Proceedings of the Royal Society B January*, 273(NUM), 1253–1260. <https://doi.org/10.1098/rspb.20053440>
- Breton, S., Burger, G., Stewart, D. T., & Blier, P. U. (2006). Comparative analysis of gender-associated complete mitochondrial genomes in marine mussels (*Mytilus* spp.). *Genetics*, 172(2), 1107–1119. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.047159>
- Brisbin, A., Bryc, K., Byrnes, J., Zakharia, F., Omberg, L., Degenhardt, J., Reynolds, A., Ostrer, H., Mezey, J. G., & Bustamante, C. D. (2012). Pcadmix: Principal components-based assignment of ancestry along each chromosome in individuals with admixed ancestry from two or more populations. *Human Biology*, 84(4), 343–364. <https://doi.org/10.3378/027.084.0401>
- Burioli, E., Trancart, S., Simon, A., Bernard, I., Charles, M., Oden, E., Bierne, N., & Houssin, M. (2019). Implementation of various approaches to study the prevalence, incidence and progression of disseminated neoplasia in mussel stocks. *Journal of Invertebrate Pathology*, 168(4), 107271. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107271>
- Campalans, M., Gonzalez, M., & Rojas, P. (Escuela de C. del M. U. C. de V. C. 1020, V. (Chile)). (1998). Neoplasia in *Mytilus chilensis* cultivated in Chiloe Island (Chile). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (United Kingdom)*. Retrieved from <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB1997047632>
- Carballal, M. J., Barber, B. J., Iglesias, D., & Villalba, A. (2015). Neoplastic diseases of marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 83–106. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2015.06.004>
- Carella, F., Figueras, A., Novoa, B., & De Vico, G. (2013). Cytomorphology and PCNA expression pattern in bivalves *Mytilus galloprovincialis* and *Cerastoderma edule* with haemic neoplasia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1), 81–87. <https://doi.org/10.3354/dao02612>
- Carrasco, N., Arzul, I., Berthe, F., Fernández-Tejedor, M., Durfort, M., & Furones, M. (2008). Delta de l'Ebre is a natural bay model for *Marteilia* spp. (Paramyxia) dynamics and life-cycle studies. *Diseases*

- of *Aquatic Organisms*, 79(1), 65–73. <https://doi.org/10.3354/dao01844>
- Charles, M., Bernard, I., Villalba, A., Oden, E., Burioli, E. A. V., Allain, G., Trancart, S., Bouchart, V., & Houssin, M. (2020). High mortality of mussels in northern Brittany – Evaluation of the involvement of pathogens, pathological conditions and pollutants. *Journal of Invertebrate Pathology*, 170, 107308. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107308>
- Coustau, C., Renaud, F., & Delay, B. (1991). Genetic characterization of the hybridization between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on the Atlantic coast of France. *Marine Biology*, 111(1), 87–93. <https://doi.org/10.1007/BF01986350>
- Coustau, C., Renaud, F., Maillard, C., Pasteur, N., & Delay, B. (1991). Differential susceptibility to a trematode parasite among genotypes of the mussel *Mytilus chilensis* (Mytilidae) and the clam *Gari solida* (Psammobiidae) from southern Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(1), 248–254. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue1-fulltext-21>
- Cuenca, J., Aleza, P., Navarro, L., & Ollitrault, P. (2013). Assignment of SNP allelic configuration in polyploids using competitive allele-specific PCR: Application to citrus triploid progeny. *Annals of Botany*, 111(4), 731–742. <https://doi.org/10.1093/aob/mct032>
- Cuppen, E. (2007). Genotyping by Allele-Specific Amplification (KASPar). *CSH Protocols*, 2007, pdb.prot4841. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT4841>
- Der Sarkissian, C., Möller, P., Hofman, C. A., Ilse, P., Rick, T. C., Schiøtte, T., Sørensen, M. V., Dalén, L., & Orlando, L. (2020). Unveiling the ecological applications of ancient DNA from mollusk shells. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 37. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00037>
- Díaz, S., Iglesias, D., Villalba, A., & Carballal, M. J. (2016). Long-term epidemiological study of disseminated neoplasia of cockles in Galicia (NW Spain): Temporal patterns at individual and population levels, influence of environmental and cockle-based factors and lethality. *Journal of Fish Diseases*, 39(9), 1027–1042. <https://doi.org/10.1111/jfd.12436>
- Elston, R. A., Kent, M. L., & Drum, A. S. (1988). Progression, lethality and remission of hemic neoplasia in the bay mussel *Mytilus edulis* (Vol. 4). Retrieved from <https://www.int-res.com/articles/dao/4/d004p135.pdf>
- Elston, R. A., Moore, J. D., & Brooks, K. (1992). Disseminated neoplasia of bivalve molluscs. *Reviews in Aquatic Sciences*, 6(5–6), 405–466.
- Farley, C. A. (1969). Sarcomatoid proliferative disease in a wild population of blue mussels (*Mytilus edulis*). *Journal of the National Cancer Institute*, 43(2), 509–516. <https://doi.org/10.1093/jnci/43.2.509>
- Figueras, A. J., Jardon, C. F., & Caldas, J. R. (1991). Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): preliminary results. *Aquaculture*, 99(1–2), 17–33. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90285-F](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90285-F)
- Fraïsse, C., Belkhir, K., Welch, J. J., & Bierne, N. (2016). Local interspecies introgression is the main cause of extreme levels of intraspecific differentiation in mussels. *Molecular Ecology*, 25(1), 269–286. <https://doi.org/10.1111/mec.13299>
- Fuentes, J., López, J., Mosquera, E., Vázquez, J., Villalba, A., & Álvarez, G. (2002). Growth, mortality, pathological conditions and protein expression of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* crosses cultured in the Ría de Arousa (NW of Spain). *Aquaculture*, 213(1–4), 233–251. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00046-7)
- Galimany, E., & Sunila, I. (2008). Several cases of disseminated neoplasia in mussels *Mytilus edulis* (L.) in Western Long Island Sound. *Journal of Shellfish Research*, 27(5), 1201–1207. <https://doi.org/10.2983/0730-8000-27.5.1201>
- García-Souto, D., Bruzos, A. L., Díaz, S., Rocha, S., Pequeño, A., Roman-Lewis, C. F., Alonso, J., Rodríguez, R., Costas, D., Rodríguez-Castro, J., Villanueva, A., Silva, L., Valencia, J. M., Annona, G., Tarallo, A., Ricardo, F., Cetinic, A. B., Posada, D., Pasantes, J. J., & Tubio, J. M. C. (2021). Mitochondrial genome sequencing of marine leukemias reveals cancer contagion between clam species in the Seas of Southern Europe. *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2021.03.10.434714>
- Gardner, J. P. A. (1994). The *Mytilus edulis* species complex in Southwest England: Multi-locus heterozygosity, background genotype and a fitness correlate. *Biochemical Systematics and Ecology*, 22(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(94\)90109-0](https://doi.org/10.1016/0305-1978(94)90109-0)
- Gombač, M., Sitar, R., Pogačnik, M., Arzul, I., & Jenčič, V. (2013). Haemocytic neoplasia in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Slovene Adriatic Sea. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 46(2), 135–143. <https://doi.org/10.1080/10236244.2013.782736>
- Grant, B. J., Rodrigues, A. P. C., Elsayy, K. M., Mccammon, J. A., & Caves, L. S. D. (2006). Bio3d: An R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics*, 22(21), 2695–2696. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl461>
- Green, M., & Alderman, D. J. (1983). Neoplasia in *Mytilus edulis* L. from United Kingdom waters. *Aquaculture*, 30(1–4), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90146-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90146-1)
- Hilbish, T. J., Bayne, B. L., & Day, A. (1994). Genetics of physiological differentiation within the marine mussel genus *Mytilus*. *Evolution*, 48(2), 267–286. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1994.tb01311.x>
- Hillman, R. E. (1993). Relationship of environmental contaminants to occurrence of neoplasia in *Mytilus edulis* populations from east and west coast mussel-watch sites. *Journal of Shellfish*, 12, 109.
- Howard, D. W., Lewis, E. J., Keller, B. J., & Smith, C. S. (2004). *Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans - Google Livres* (5, 218 pp). National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum, National Ocean Service, National Center for Coastal Ocean Science.
- Jombart, T., & Ahmed, I. (2011). adegenet 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27(21), 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kwon, Y. M., Gori, K., Park, N., Potts, N., Swift, K., Wang, J., Stammnitz, M. R., Cannell, N., Baez-Ortega, A., Comte, S., Fox, S., Harmsen, C., Huxtable, S., Jones, M., Kreiss, A., Lawrence, C., Lazenby, B., Peck, S., Pye, R., ... Murchison, E. P. (2020). Evolution and lineage dynamics of a transmissible cancer in *Tasmanian devils*. *PLOS Biology*, 18(11), e3000926. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000926>
- Laakkonen, H. M., Hardman, M., Strelkov, P., & Väinölä, R. (2021). Cycles of trans-Arctic dispersal and vicariance, and diversification of the amphiboreal marine fauna. *Journal of Evolutionary Biology*, 34(1), 73–96. <https://doi.org/10.1111/jeb.13674>
- Landsberg, J. H. (1996). Neoplasia and biotoxins in bivalves: Is there a connection? *Journal of Shellfish Research*, 15(2), 203–230.
- Layton, K. K. S., Martel, A. L., & Hebert, P. D. N. (2014). Patterns of DNA barcode variation in Canadian marine molluscs. *PLoS One*, 9(4), e95003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095003>
- Leathlobhair, M. N., Gulland, F. M. D., & Murchison, E. P. (2017). No evidence for clonal transmission of urogenital carcinoma in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Wellcome Open Research*, 2, 46. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.11483.1>

- Leathlobhair, M. N., Perri, A. R., Irving-Pease, E. K., Witt, K. E., Linderholm, A., Haile, J., Lebrasseur, O., Ameen, C., Blick, J., Boyko, A. R., Brace, S., Cortes, Y. N., Crockford, S. J., Devault, A., Dimopoulos, E. A., Eldridge, M., Enk, J., Gopalakrishnan, S., Gori, K., ... Frantz, L. A. F. (2018). The evolutionary history of dogs in the Americas. *Science*, 361(6397), 81–85. <https://doi.org/10.1126/science.aao4776>
- Lesser, M. P., Bailey, M. A., Merselis, D. G., & Morrison, J. R. (2010). Physiological response of the blue mussel *Mytilus edulis* to differences in food and temperature in the Gulf of Maine. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 156(4), 541–551. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.04.012>
- Li, D., Luo, R., Liu, C.-M., Leung, C.-M., Ting, H.-F., Sadakane, K., Yamashita, H., & Lam, T.-W. (2016). MEGAHIT v1.0: A fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. *Methods*, 102, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.02.020>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Lohrmann, K. B., Bustos, E., Rojas, R., Navarrete, F., Robotham, H., & Bignell, J. (2019). Histopathological assessment of the health status of *Mytilus chilensis* (Hupé 1854) in southern Chile. *Aquaculture*, 503, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.080>
- Lowe, D. M., & Moore, M. N. (1978). Cytology and quantitative cytochemistry of a proliferative atypical hemocytic condition in *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mollusca). *Journal of the National Cancer Institute*, 60(6), 1455–1459. <https://doi.org/10.1093/jnci/60.6.1455>
- Marko, P. B., Hoffman, J. M., Emme, S. A., McGovern, T. M., Keever, C. C., & Nicole Cox, L. (2010). The “expansion-Contraction” model of Pleistocene biogeography: Rocky shores suffer a sea change? *Molecular Ecology*, 19(1), 146–169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04417.x>
- Matozzo, V., Ercolini, C., Serracca, L., Battistini, R., Rossini, I., Granato, G., Quagliari, E., Perolo, A., Finos, L., Arcangeli, G., Bertotto, D., Radaelli, G., Chollet, B., Arzul, I., & Quaglio, F. (2018). Assessing the health status of farmed mussels (*Mytilus galloprovincialis*) through histological, microbiological and biomarker analyses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 153, 165–179. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.018>
- McClelland, S. E. (2017). Role of chromosomal instability in cancer progression. *Endocrine-Related Cancer*, 24(9), T23–T31. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0187>
- Md, V., Misra, S., Li, H., & Aluru, S. (2019). Efficient architecture-aware acceleration of BWA-MEM for multicore systems. In *Proceedings - 2019 IEEE 33rd International Parallel and Distributed Processing Symposium, IPDPS 2019* (pp. 314–324). Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc. <https://doi.org/10.1109/IPDPS.2019.00041>
- Metzger, M. J., Reinisch, C., Sherry, J., & Goff, S. P. (2015). Horizontal transmission of clonal cancer cells causes leukemia in soft-shell clams. *Cell*, 161(2), 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.042>
- Metzger, M. J., Villalba, A., Carballal, M. J., Iglesias, D., Sherry, J., Reinisch, C., Muttray, A. F., Baldwin, S. A., & Goff, S. P. (2016). Widespread transmission of independent cancer lineages within multiple bivalve species. *Nature*, 534(7609), 705–709. <https://doi.org/10.1038/nature18599>
- Miroshnychenko, D., Baratchart, E., Ferrall-Fairbanks, M. C., Velde, R. V., Laurie, M. A., Bui, M. M., Tan, A. C., Altrock, P. M., Basanta, D., & Marusyk, A. (2021). Spontaneous cell fusions as a mechanism of parasexual recombination in tumour cell populations. *Nature Ecology and Evolution*, 5(3), 379–391. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01367-y>
- Mix, M. C. (1983). Haemic neoplasms of bay mussels, *Mytilus edulis* L., from Oregon: Occurrence, prevalence, seasonality and histopathological progression. *Journal of Fish Diseases*, 6(3), 239–248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1983.tb00072.x>
- Moore, J. D., Elston, R. A., Drum, A. S., & Wilkinson, M. T. (1991). Alternate pathogenesis of systemic neoplasia in the bivalve mollusc *Mytilus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58(2), 231–243. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90067-Z](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90067-Z)
- Moreira, R., Balseiro, P., Forn-Cuní, G., Milan, M., Bargelloni, L., Novoa, B., & Figueras, A. (2018). Bivalve transcriptomics reveal pathogen sequences and a powerful immune response of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Marine Biology*, 165(4), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s00227-018-3308-0>
- Murgia, C., Pritchard, J. K., Kim, S. Y., Fassati, A., & Weiss, R. A. (2006). Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*, 126(3), 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.051>
- Muttray, A. F., & Vassilenko, K. (2018). Mollusca: Disseminated neoplasia in bivalves and the p53 protein family. *Advances in Comparative Immunology* (pp. 953–979). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_28
- Nichols, C. A., Gibson, W. J., Brown, M. S., Kosmicki, J. A., Busanovich, J. P., Wei, H., Urbanski, L. M., Curimjee, N., Berger, A. C., Gao, G. F., Cherniack, A. D., Dhe-Paganon, S., Paoletta, B. R., & Beroukhi, R. (2020). Loss of heterozygosity of essential genes represents a widespread class of potential cancer vulnerabilities. *Nature Communications*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16399-y>
- Noubissi, F. K., & Ogle, B. M. (2016). Cancer cell fusion: Mechanisms slowly unravel. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1587–https://doi.org/10.3390/ijms17091587
- Paradis, E., & Schliep, K. (2018). ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35(3), 526–528. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>
- Patton, A. H., Lawrance, M. F., Margres, M. J., Kozakiewicz, C. P., Hamede, R., Ruiz-Aravena, M., Hamilton, D. G., Comte, S., Ricci, L. E., Taylor, R. L., Stadler, T., Leaché, A., McCallum, H., Jones, M. E., Hohenlohe, P. A., & Storfer, A. (2020). A transmissible cancer shifts from emergence to endemism in *Tasmanian devils*. *Science*, 370(6522), eabb9772. <https://doi.org/10.1126/science.abb9772>
- Pearse, A. M., & Swift, K. (2006). Allograft theory: Transmission of devil facial-tumour disease. *Nature*, 439(7076), 549. <https://doi.org/10.1038/439549a>
- Pienta, K. J., Hammarlund, E. U., Axelrod, R., Brown, J. S., & Amend, S. R. (2020). Poly-aneuploid cancer cells promote evolvability, generating lethal cancer. *Evolutionary Applications*, 13(7), 1626–1634. <https://doi.org/10.1111/eva.12929>
- Popovic, I., Matias, A. M. A., Bierne, N., & Riginos, C. (2020). Twin introductions by independent invader mussel lineages are both associated with recent admixture with a native congener in Australia. *Evolutionary Applications*, 13(3), 515–532. <https://doi.org/10.1111/eva.12857>
- Pye, R. J., Pemberton, D., Tovar, C., Tubio, J. M. C., Dun, K. A., Fox, S., Darby, J., Hayes, D., Knowles, G. W., Kreiss, A., Siddle, H. V. T., Swift, K., Lyons, A. B., Murchison, E. P., & Woods, G. M. (2016). A second transmissible cancer in *Tasmanian devils*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 113(2), 374–379. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519691113>
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. Retrieved from <http://www.r-project.org/index.html>
- Rasmussen, L. P. D. (1986). Occurrence, prevalence and seasonality of neoplasia in the marine mussel *Mytilus edulis* from three sites in Denmark. *Marine Biology: International Journal on Life in Oceans and Coastal Waters*, 92(1), 59–64. <https://doi.org/10.1007/BF00392746>
- Rebbeck, C. A., Thomas, R., Breen, M., Leroi, A. M., & Burt, A. (2009). Origins and evolution of a transmissible cancer. *Evolution*, 63(9), 2340–2349. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00724.x>

- Riquet, F., Simon, A., & Bierne, N. (2017). Weird genotypes? Don't discard them, transmissible cancer could be an explanation. *Evolutionary Applications*, 10(2), 140–145. <https://doi.org/10.1111/eva.12439>
- Seed, R. (1969). The incidence of the Pea crab, *Pinnotheres pisum* in the two types of *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia) from Padstow, south-west England. *Journal of Zoology*, 158(4), 413–420. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1969.tb02158.x>
- Semagn, K., Babu, R., Hearne, S., & Olsen, M. (2014). Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding*, 33(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9917-x>
- Simon, A., Arbiol, C., Nielsen, E. E., Couteau, J., Sussarellu, R., Burgeot, T., Bernard, I., Coolen, J. W. P., Lamy, J.-B., Robert, S., Skazina, M., Strelkov, P., Queiroga, H., Cancio, I., Welch, J. J., Viard, F., & Bierne, N. (2020). Replicated anthropogenic hybridisations reveal parallel patterns of admixture in marine mussels. *Evolutionary Applications*, 13(3), 575–599. <https://doi.org/10.1111/eva.12879>
- Simon, A., Fraïsse, C., El Ayari, T., Liautard-Haag, C., Strelkov, P., Welch, J. J., & Bierne, N. (2021). How do species barriers decay? Concordance and local introgression in mosaic hybrid zones of mussels. *Journal of Evolutionary Biology*, 34(1), 208–223. <https://doi.org/10.1111/jeb.13709>
- Skazina, M., Odintsova, N., Maiorova, M., Ivanova, A., Väinölä, R., & Strelkov, P. (2021). First description of a widespread *Mytilus trossulus*-derived bivalve transmissible cancer lineage in *M. trossulus* itself. *Scientific Reports*, 11(5809), <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85098-5>
- Skibinski, D. O. F., Beardmore, J. A., & Cross, T. F. (1983). Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae; Mollusca) in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society*, 19(2), 137–183. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1983.tb00782.x>
- Śmietanka, B., & Burzyński, A. (2017). Disruption of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA associated with hybridization area of European *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus* in Norway. *Marine Biology*, 164(11), 209. <https://doi.org/10.1007/s00227-017-3235-5>
- Strakova, A., Ní Leathlobhair, M., Wang, G.-D., Yin, T.-T., Airikkala-Otter, I., Allen, J. L., Allum, K. M., Banske-Issa, L., Bisson, J. L., Castillo Domracheva, A., de Castro, K. F., Corrigan, A. M., Cran, H. R., Crawford, J. T., Cutter, S. M., Delgadillo Keenan, L., Donelan, E. M., Faramade, I. A., Flores Reynoso, E., ... Murchison, E. P. (2016). Mitochondrial genetic diversity, selection and recombination in a canine transmissible cancer. *Elife*, 5(5), 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.14552>
- Strakova, A., Nicholls, T. J., Baez-Ortega, A., Ní Leathlobhair, M., Sampson, A. T., Hughes, K., Bolton, I. A. G., Gori, K., Wang, J., Airikkala-Otter, I., Allen, J. L., Allum, K. M., Arnold, C. L., Banske-Issa, L., Bhutia, T. N., Bisson, J. L., Blank, K., Briceño, C., Castillo Domracheva, A., ... Murchison, E. P. (2020). Recurrent horizontal transfer identifies mitochondrial positive selection in a transmissible cancer. *Nature Communications*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16765-w>
- Sunila, I. (1987). Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvarminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Annales Zoologici Fennici*, 24, 55–69.
- Ujvari, B., Gatenby, R. A., & Thomas, F. (2016). The evolutionary ecology of transmissible cancers. *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.MEEGID.2016.02.005>
- Usheva, L. N., & Frolova, L. T. (2000). A connective tissue tumor in the mussel *Mytilus trossulus* from a polluted region of Nakhodka Bay, the Sea of Japan. *Ontogenez*, 31(1), 63–70.
- Väinölä, R., & Strelkov, P. (2011). *Mytilus trossulus* in Northern Europe. *Marine Biology*, 158(4), 817–833. <https://doi.org/10.1007/s00227-010-1609-z>
- Vassilenko, E., & Baldwin, S. A. (2014). Using flow cytometry to detect haemic neoplasia in mussels (*Mytilus trossulus*) from the Pacific Coast of Southern British Columbia, Canada. *Journal of Invertebrate Pathology*, 117, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.02.002>
- Villalba, A., Mourelle, S., Carballal, M., & López, C. (1997). Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rias of Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, 31(2), 127–139. <https://doi.org/10.3354/dao031127>
- Yonemitsu, M. A., Giersch, R. M., Polo-Prieto, M., Hammel, M., Simon, A., Cremonte, F., Avilés, F. T., Merino-Véliz, N., Burioli, E. A. V., Muttray, A. F., Sherry, J., Reinisch, C., Baldwin, S. A., Goff, S. P., Houssin, M., Arriagada, G., Vázquez, N., Bierne, N., & Metzger, M. J. (2019). A single clonal lineage of transmissible cancer identified in two marine mussel species in South America and Europe. *Elife*, 8, 1–21. <https://doi.org/10.7554/eLife.47788>
- Zbawicka, M., Wenne, R., & Burzyński, A. (2014). Mitogenomics of recombinant mitochondrial genomes of Baltic Sea *Mytilus* mussels. *Molecular Genetics and Genomics*, 3(6), 1275–1287. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0888-3>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Hammel, M., Simon, A., Arbiol, C., Villalba, A., Burioli, E. A. V., Pépin, J.-F., Lamy, J.-B., Benabdelmouna, A., Bernard, I., Houssin, M., Charrière, G. M., Destoumieux-Garzon, D., Welch, J. J., Metzger, M. J., & Bierne, N. (2021). Prevalence and polymorphism of a mussel transmissible cancer in Europe. *Molecular Ecology*, 00, 1–16. <https://doi.org/10.1111/mec.16052>

Supplemental Information for:

Prevalence and polymorphism of a mussel transmissible cancer in Europe

Maurine Hammel^{(1,2)*}, Alexis Simon⁽¹⁾, Christine Arbiol⁽¹⁾, Antonio Villalba^(3,4,5), Erika AV Burioli^(2,6), Jean-François Pépin⁽⁷⁾, Jean-Baptiste Lamy⁽⁸⁾, Abdellah Benabdelmouna⁽⁸⁾, Ismael Bernard⁽⁹⁾, Maryline Houssin⁽⁶⁾, Guillaume M Charrière⁽²⁾, Delphine Destoumieux-Garzon⁽²⁾, John J Welch⁽¹⁰⁾, Michael J Metzger⁽¹¹⁾, Nicolas Bierne⁽¹⁾

⁽¹⁾ISEM, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

⁽²⁾IHPE, Univ Montpellier, CNRS, Ifremer, Univ Perpignan, Via Domitia, France

⁽³⁾Centro de Investigacións Mariñas, Consellería do Mar, Xunta de Galicia, Vilanova de Arousa, Spain

⁽⁴⁾ Departamento de Ciencias de la Vida, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Spain.

⁽⁵⁾ Research Centre for Experimental Marine Biology and Biotechnology (PIE), University of the Basque Country (UPV/EHU), Plentzia, Basque Country, Spain

⁽⁶⁾LABÉO, Caen, France

⁽⁷⁾Laboratoire Environnement ressources des Pertuis Charentais, IFREMER, La Tremblade, France

⁽⁸⁾Santé, Génétique, Microbiologie des Mollusques, IFREMER, La Tremblade, France

⁽⁹⁾Eurêka Mer, Lézardrieux, France

⁽¹⁰⁾Department of Genetics, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge, UK

⁽¹¹⁾Pacific Northwest Research Institute, Seattle, USA

*Corresponding author address: maurine.hammel@umontpellier.fr

Figure S1: Graphical inference of the 6 MtrBTN2 tumors genotypes at 76 SNPs. (A) KASP fluorescence data plot where genotypes are indicated by colored points. **(B)** Correlation plot between y'_i fluorescence signal and MtFF2 (*M. trossulus* fluorescence fraction 2, proxy of the proportion of cancerous cell in the sample). *M. edulis* samples are represented in red (MtFF2 value close to 0) and *M. trossulus* samples are represented in yellow (MtFF2 value close to 1). In both panels, the 6 tumors are represented in black: triangle filled correspond to hemolymph samples and open triangle to mantle/gill samples (samples from the same individual are related by a pointed line).

=> See Supplementary Figure S1 on online version of the manuscript (74 pages pdf)

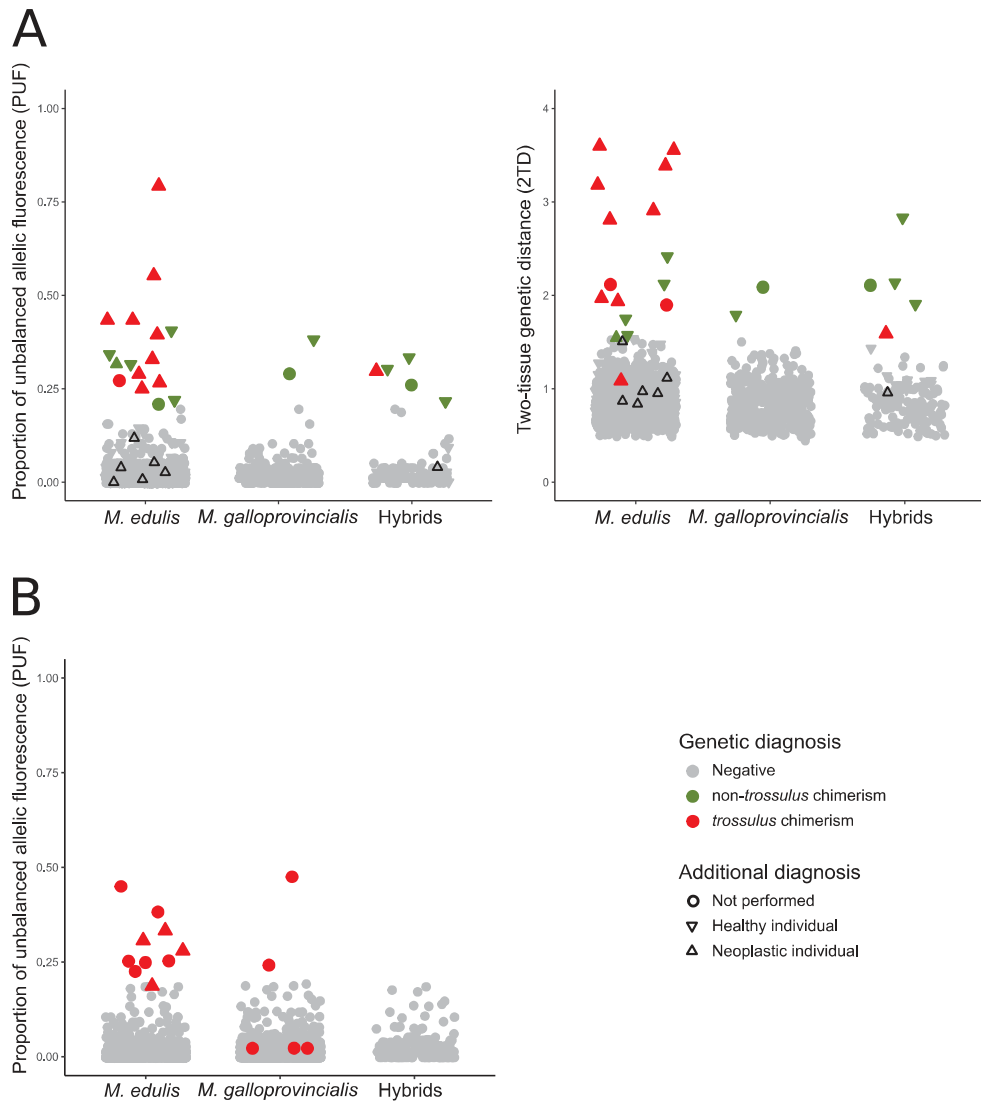


Figure S2: Proportion of unbalanced allelic Fluorescence (PUF) and two-tissue genetic distance (2TD) used for genetic diagnosis. (A) PUF (left) and 2TD (right) values for individuals sampled at two tissues. Colors correspond to genetic diagnosis: red for *trossulus* chimeric individuals (positive to MtFF, PUF and mostly 2TD), green for non-*trossulus* chimeric individuals (positive to PUF and 2TD indexes) and grey for non-chimeric individuals (negative to all indexes). The symbol corresponds to phenotypic diagnosis: triangle pointing upwards for neoplastic individuals, triangle pointing downwards for healthy individuals and a dot for not performed. Black triangles pointing upwards represent neoplastic individuals of type B which are not chimeric (negative to all indexes). **(B)** PUF values for single-sampled individuals. Colors correspond to genetic diagnosis: red for *trossulus* chimerism (positive to MtFF) and grey for non-chimeric individuals (negative to MtFF). The symbol form corresponds to additional diagnosis methods (histology, cytology or flow cytometry): triangle pointing upwards for neoplastic individuals, triangle pointing

downwards for healthy individuals and a dot for not performed. **(A, B)** Note that all grey points correspond to the baseline of 2TD and PUF statistics in healthy mussels.

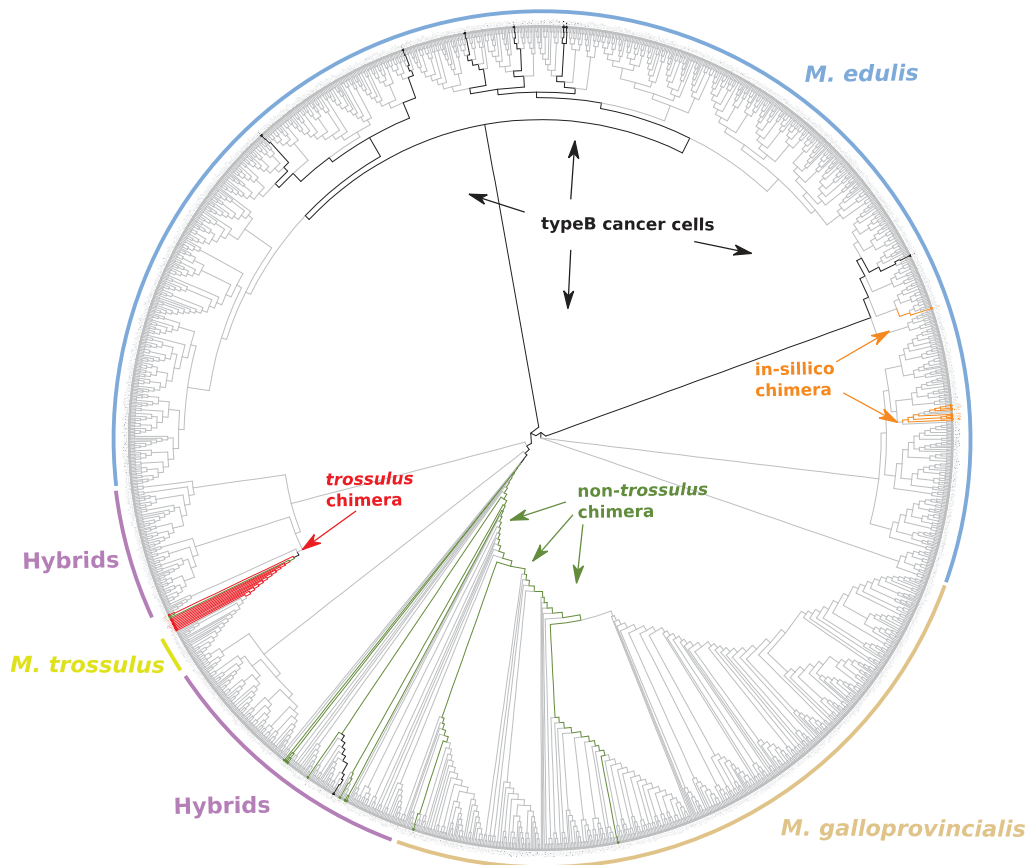


Figure S3: Neighbor-joining Tree estimated on all SNPs fluorescence values (y'_i). Color corresponds to genetic diagnosis: red for *trossulus* chimerism (MtrBTN2), green for non-*trossulus* chimerism, grey for non-chimeric individuals and black for non-chimeric individuals with neoplastic type B cells. Orange branch corresponds to in silico chimera generated by mixing one sample (“cancer”) with 9 others samples (“hosts”) at 40%, 60% or 80% (3 of each).

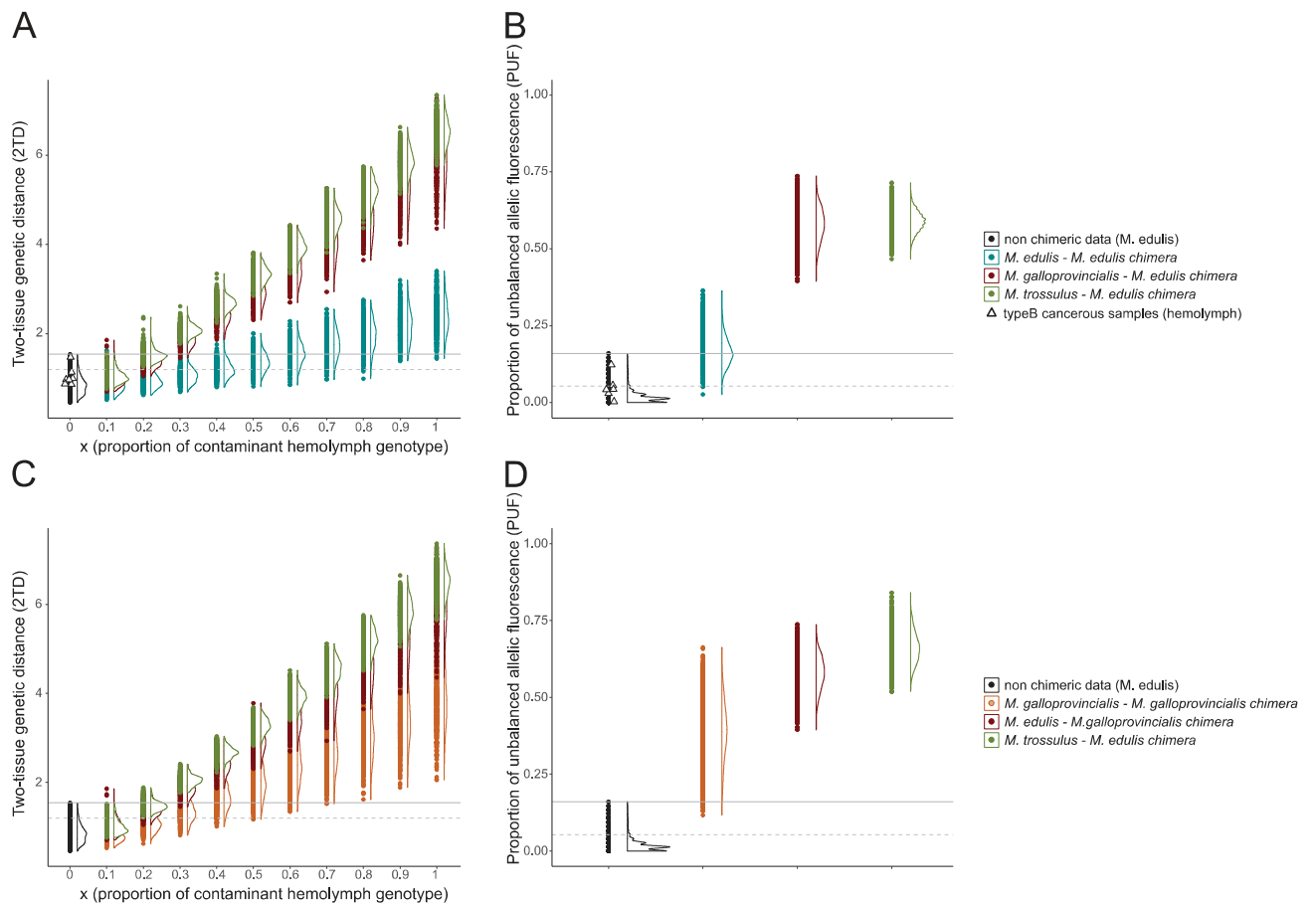


Figure S4: PUF and 2TD estimation of in silico chimera. Panels (A) and (B) correspond to PUF and 2TD values (respectively) estimated for in silico chimera in *M. edulis* « hosts », while panels (C) and (D) correspond to PUF and 2TD values (respectively) estimated for in-silico chimera in *M. galloprovincialis* « hosts ». Colored circles correspond to intraspecific (blue and orange circles) and interspecific (green and red circles) mixed genotypes, black circles corresponds to non-chimeric mussels performed of this study and typeB cancerous samples are reported by black triangle. Curves indicate the distribution of values and grey lines correspond to the maximum (continuous line) and percentile 95% (dotted line) of PUF and 2TD in non-chimeric individuals.

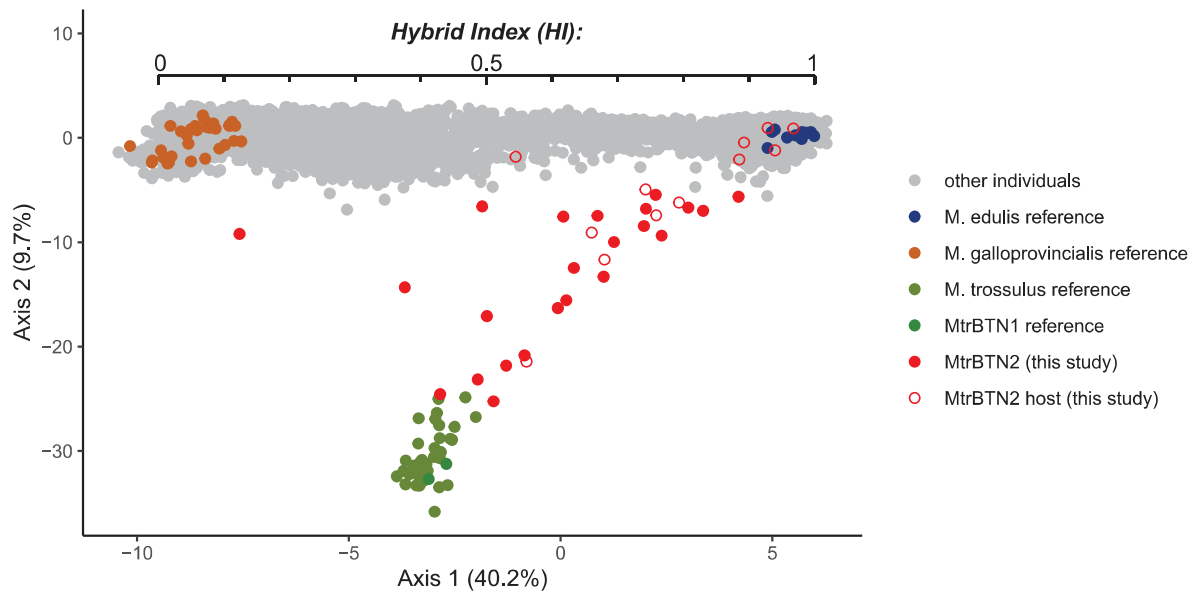


Figure S5: Mussels classification as *M. edulis*, *M. galloprovincialis* or hybrid. PCA on all SNP y'_i values (VAFF). The first axis discriminates *M. edulis* (blue) from *M. galloprovincialis* (orange). We use it to infer a hybrid index and assign the European mussels to *M. edulis* ($HI > 0.85$), *M. galloprovincialis* ($HI < 0.4$) or hybrids ($0.4 < HI < 0.85$) genetic backgrounds.

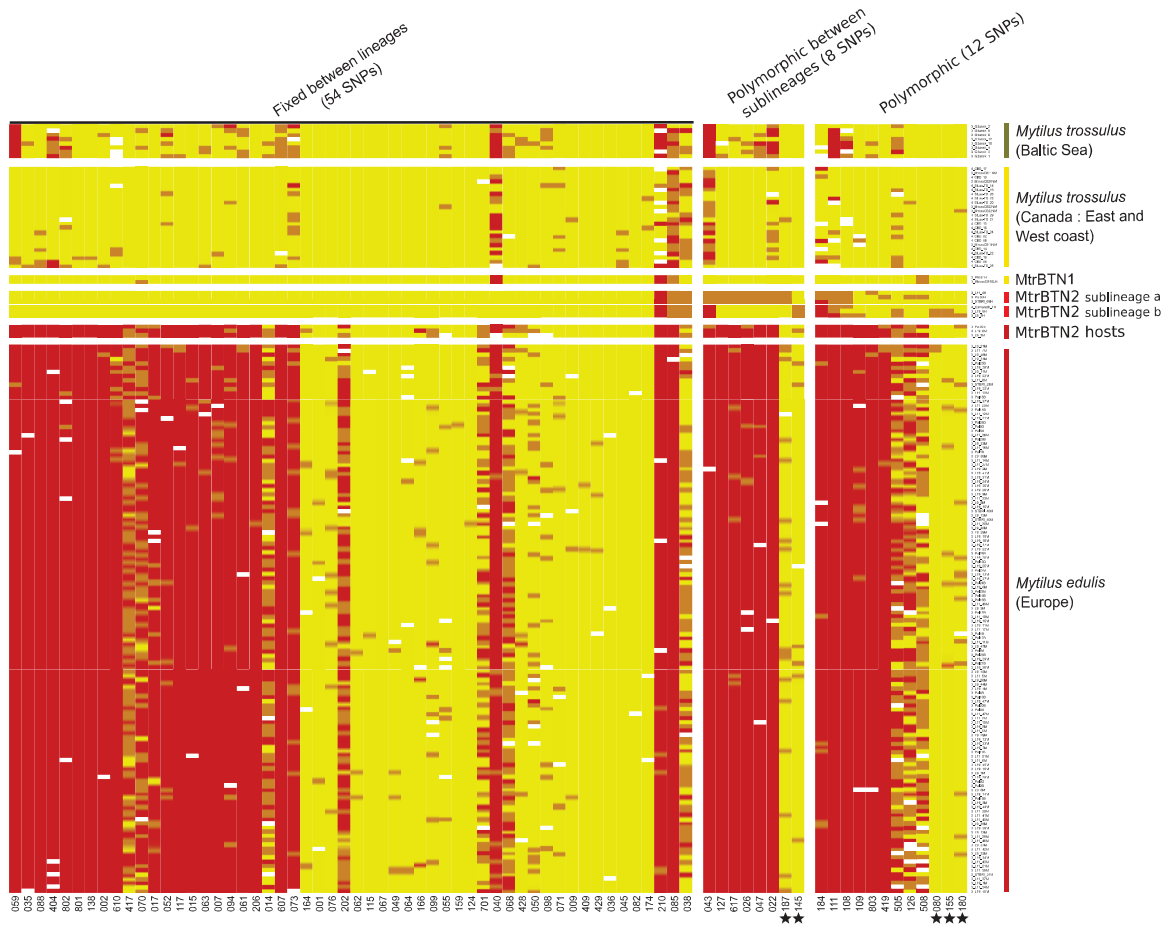


Figure S6: Plot of genotypes for all mitochondrial and nuclear SNPs in column and individuals in rows. Red: homozygote of *M. edulis/galloprovincialis*-state allele; yellow: homozygote of *M. trossulus*-state allele; orange: heterozygote; white: missing data. The first fifty-four columns correspond to nuclear SNPs fixed in the 6 MtrBTN2 tumors, the next eight to SNPs fixed between the two sublineages, and the final 12 to SNPs revealing polymorphism within each sublineage. Black stars highlight the five SNPs for which *M.edulis/galloprovincialis*-state alleles in tumors are not explained by the null allele hypothesis. Note that SNPs which appears homozygote for the *M. trossulus*-state allele (yellow) in both *M. edulis* and *M. trossulus* healthy mussels correspond to SNPs nearly fixed for the *M. edulis/galloprovincialis*-state allele in *M. galloprovincialis* populations (not shown here, see allele frequencies in Table S2).

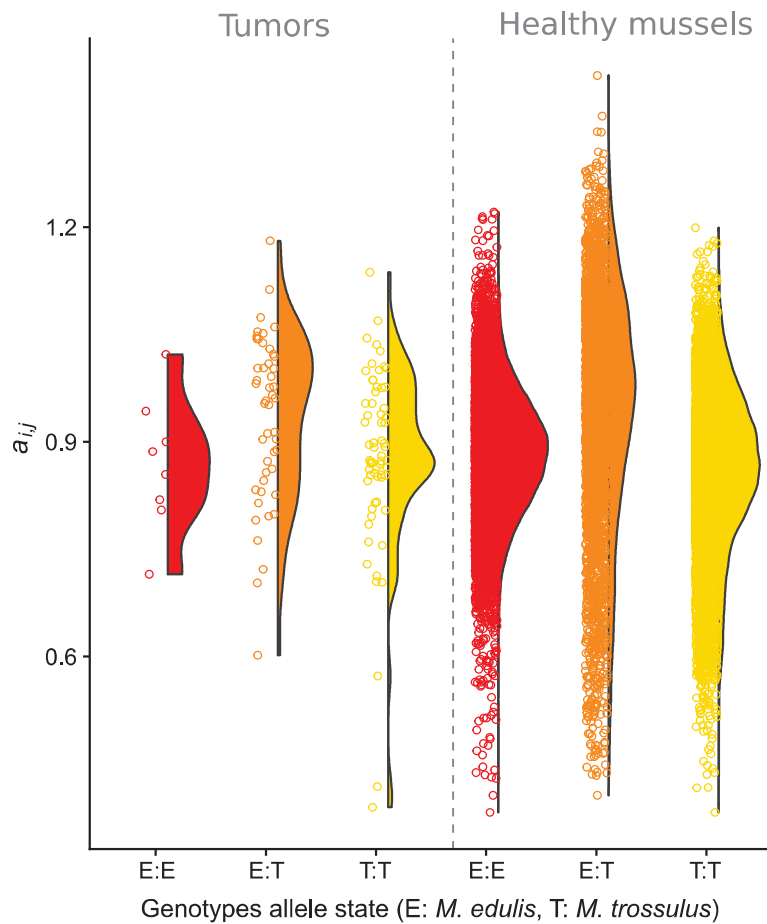


Figure S7: Fluorescence signal intensity (index of amplification, $a_{i,j}$) among genotypes of tumors and healthy mussels. Genotypes of the 20 polymorphic SNPs (referring to Figure 6 and S6) are reported in three categories: “E:E” homozygote for *M. edulis/galloprovincialis*-state allele (red); “T:T” homozygote for *M. trossulus*-state allele homozygote (yellow); “E:T” heterozygote (orange). The 6 tumors fluorescence signal for each genotypes are reported on the right while healthy mussels once are on the left (healthy mussels correspond to *M. edulis* individuals shown in Figure S6). Distribution of the fluorescence signal do not show decrease in tumors compared to healthy mussels as expected under the null allele hypothesis.

Table S1: Description of the sampled locations of *M. trossulus* references (PopRef) and *M. edulis* and *M. galloprovincialis* individuals (PopEu). Pop: population name; N: number of individuals sampled; Lat: latitude; Long: longitude; MtrBTN1: number of individuals with MtrBTN1 tumor; MtrBTN2: number of individuals with MtrBTN2, the tumor detected in this study; DNB: number of individuals with disseminated neoplasia type B (non-transmissible cancer).

See Supplementary Table S1 on online version of the manuscript

Table S2: Bi-allelic SNPs informations. Freq_tross, freq_edu, freq_gallo correspond to allele frequency in references populations; Allele: allele the most frequent in *M. trossulus* references populations; MtFF: 10 diagnostics SNPs used to estimate *M. trossulus* fluorescence fraction; MtFF2: 17 diagnostics SNPs used to estimate the proportion of cancer cells in the 6 MtrBTN2 tumors from *M. edulis* hosts; Sequence: sequence around the SNP targeted in KASP experiment, alleles are represented [alleleX/alleleY].

See Supplementary Table S2 on online version of the manuscript

Table S3: Results of additional diagnosis methods. Pop: population. N: number of individuals. Unchim: diagnosed as non-chimeric. NMt-Chim: diagnosed as non-*trossulus* chimeric (not due to cancer). Mt-Chim: diagnosed as *trossulus* chimeric (transmissible cancer, MtrBTN2). MtFF: *M. trossulus* Fluorescence Fraction value. DN-type: cell type described in results section. NP: not performed.

See Supplementary Table S3 on online version of the manuscript

Table S4: *Mytilus trossulus* and MtrBTN COI sequences used for MP phylogenetic tree.

See Supplementary Table S4 on online version of the manuscript

Table S5: 2TD, PUF and MtFF values for the 5907 European mussels screened. For mussels sampled at hemolymph and mantle tissues, both associated statistics values are reported (see “Sample type” and “Tissue type” columns).

See Supplementary Table S5 on online version of the manuscript

Table S6: Results of real-time PCR of EF1 α -H (Yonemitsu et al. 2019). Double-sampled: mussels sampled on hemolymph and mantle tissue; Single-sampled: mussels samples on hemolymph or gill tissue; MtFF: *M. trossulus* Fluorescence Fraction value; -: *trossulus* chimerism: positive to almost two indexes (MtFF and PUF or 2TD); +: specific amplification of EF1 α -H on real-time PCR; NP: not performed.

See Supplementary Table S6 on online version of the manuscript

Table S7: Inferred genotypes of the 6 MtrBTN2 tumors (hemolymph and mantle samples). Call_LGC : calling performed by LGC; Call_infered : inferred genotypes (see also FigureS1).

See Supplementary Table S7 on online version of the manuscript

--- Chapitre 2 ---

Distribution et prévalence du cancer transmissible MtrBTN2 dans une zone hybride de moules *Mytilus* en Bretagne Sud

MtrBTN2, une lignée cancéreuse qui se promène de ports en ports...

Ce chapitre a fait l'objet d'un encadrement de stage de master 1 d'Elisa Chailier.

1. Contexte et objectifs

Les différentes études menées sur le MtrBTN2 ont permis de montrer que ce cancer affecte au moins 4 espèces du genre *Mytilus* à travers le monde : *M. trossulus* en mer du Japon (Skazina et al., 2021), *M. chilensis* en Patagonie (Yonemitsu et al., 2019), *M. edulis* (Burioli et al., 2019; Yonemitsu et al., 2019) et *M. galloprovincialis* en Europe (Hammel et al., 2021). Dans le précédent chapitre, la détection du cancer transmissible MtrBTN2 en Europe a permis de mettre en évidence une faible prévalence à grande échelle mais des prévalences différentes entre les deux espèces : de l'ordre de 1/100 chez *M. edulis* et de l'ordre de 1/1000 chez *M. galloprovincialis*, avec une prévalence intermédiaire chez les hybrides. Ces résultats nous ont donc poussé à réaliser un criblage avec un maillage spatial homogène dans une zone hybride mosaïque, où les deux espèces coexistent et peuvent s'hybrider (Bretagne Sud, côte Atlantique) pour étudier la répartition du MtrBTN2 à plus fine échelle et étudier les facteurs environnementaux associés aux sites échantillonnés. En plus d'une diversité de fonds génétiques, cette zone abrite des habitats aux variables environnementales variées (exposition aux vagues, salinité, courant, etc.) et des sites plus ou moins anthropisés (ports, élevages, bancs naturels, etc.). Dans l'idée de mieux comprendre la dynamique épidémiologique du MtrBTN2, les objectifs de cette étude étaient donc de voir (i) si les différences de prévalence retrouvées à l'échelle européenne étaient également conservées à l'échelle locale, (ii) si la distribution des prévalences était liée à la structuration génétique des populations d'hôtes, et/ou (iii) si des facteurs environnementaux pouvait être liés à la répartition du MtrBTN2 dans cette zone.

2. Résumé de l'article

Dans cette étude, nous avons échantillonné 1516 moules pour étudier la présence du MtrBTN2 dans 76 sites d'une zone hybride mosaïque entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis*. Pour la détection du MtrBTN2, de nouveaux marqueurs nucléaires et mitochondriaux ont été conçus et ont été utilisés à l'aide de deux méthodes PCR, dont nous avons pu comparer la sensibilité : la PCR en temps réel et la digital PCR. Le criblage a révélé une prévalence globalement faible (23/1516) mais qui varie entre les différents sites échantillonnés (allant de 1/20 à 8/20). De manière inattendue, la majorité des sites touchés se sont avérés être des ports, dont un présentant une forte prévalence (8/20) et qui pourrait représenter un « point chaud », d'autant plus qu'il s'agit d'un quai de navette touristiques connu pour desservir les ports avoisinants. Dans la majorité des bancs naturels, dont ceux directement hors des

ports affectés, et la totalité des élevages et des bouées flottantes échantillonnées, aucun cas de MtrBTN2 n'a été détecté. Les seuls bancs naturels colonisés par le MtrBTN2 se sont avérés être proches du «point chaud», suggérant un effet de débordement (*spillover*) depuis ce site vers les populations naturelles. Les ports pourraient donc représenter un habitat favorable à la transmission de MtrBTN2 et/ou le transport maritime pourrait jouer un rôle de vecteur pour la propagation du MtrBTN2 via le *biofouling*, suggérant que les ports sont des plaques tournantes épidémiologiques et des passerelles anthropiques pour la propagation de MtrBTN2.

La question du lien entre la prévalence et le fond génétique n'a pas pu être directement abordée car le génotypage des individus n'est pas encore achevé.

3. Article 2

Cet article est en préparation.

Environmental correlates of MtrBTN2 prevalence suggest ports are epidemiological hubs for this marine transmissible cancer

Hammel M.^{1,2}, Paradis L.¹, Chailier E.¹, Bernard I.³, Coquet H.⁴, Burioli E. A. V.^{1,2}, Simon A.¹, Thomas F.⁵, Destoumieux-Garzon D.², Charrière G. M.², Bierne N.¹

¹ ISEM, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

² IHPE, Univ Montpellier, CNRS, Ifremer, Univ Perpignan, Perpignan, France

³ Eurêka Mer, Lézardrieux, France

⁴ Cochet Environnement, 56550 Local

⁵ CREEC/CANECEV (CREES), MIVEGEC, Unité Mixte de Recherches, IRD 224–CNRS 5290–Université de Montpellier, Montpellier, France

Abstract

Transmissible cancers are unusual microparasites that spread between hosts by direct transmission of living cancer cells. First described in dogs and Tasmanian devils, they have recently been shown to be widespread in marine bivalves. *Mytilus* mussels are affected by two lineages of bivalve transmissible neoplasia (BTN), MtrBTN1 and MtrBTN2, both of which emerged in a *Mytilus trossulus* founder individual. The MtrBTN2 lineage is known to affect four *Mytilus* species around the world, but little is known about the ecology of the affected hosts and environmental factors that can favour its dispersal. In this investigation, we sampled 1516 mussels to study the presence of MtrBTN2 at 76 sites in the *M. edulis* and *M. galloprovincialis* mosaic hybrid zone along the French Atlantic coast that are characterised by contrasting natural and anthropogenic habitats. We designed new real-time PCR and digital PCR (ddPCR) nuclear and mitochondrial markers. We detected MtrBTN2 at low prevalence; most of the affected sites were ports, including one prevalence hotspot at a shuttle landing dock. Few cancers were found in natural beds except for around this hotspot, suggesting a spillover effect. Natural sites adjacent to other ports with cancers, mussel farms, buoys, and dense natural beds were all MtrBTN2-free. Ports could represent a favourable habitat for MtrBTN2 transmission, and/or maritime transport could play

the role of vector for spreading the disease via biofouling, suggesting ports are epidemiological hubs and anthropogenic gateways for MtrBTN2 propagation.

Introduction

Transmissible cancers are malignant cell lineages that have gained the ability to infect new hosts by transmission of living cells. Ten transmissible cancer lineages have been described to date: one in dogs (canine transmissible venereal tumour, CTVT; Murgia et al., 2006; Rebbeck et al., 2009), two in Tasmanian devils (devil facial tumour disease, DFT1 and 2; Pearse & Swift, 2006; Pye et al., 2016), and seven in different marine bivalves species (bivalve transmissible neoplasia, BTNs; Garcia-Souto et al., 2021; Metzger et al., 2015, 2016; Yonemitsu et al., 2019). While direct contact is necessary for CTVT and DFT transmission, via coitus for the former and biting for the latter, BTN transmission between sessile shellfish is assumed to occur through the water column. *Mytilus* spp. mussels are affected by two BTN lineages known as MtrBTN1 and MtrBTN2 that originated in different *M. trossulus* founder hosts. MtrBTN2 is distributed worldwide and has crossed the species barrier several times to infect four *Mytilus* species: *M. trossulus* in East Asia (Skazina et al., 2021), *M. chilensis* in South America (Yonemitsu et al., 2019), and *M. edulis* and *M. galloprovincialis* in Europe (Hammel et al., 2021; Yonemitsu et al., 2019). The oldest MtrBTN2 sample is 11 years old, and genetic studies suggest it could be quite an ancient cancerous lineage even though dating is difficult because of an apparent acceleration of the mitochondrial clock (Hammel et al., 2021; Skazina et al., 2021).

The global distribution of this clonally spreading BTN lineage remains puzzling (Yonemitsu et al., 2019). The other known transmissible cancer with such a worldwide distribution is CTVT in dogs. It emerged 4000 to 8000 years ago, likely in Asia, and had a rapid global expansion over the last 500 years, likely helped by human maritime transfer (Baez-Ortega et al., 2019). Even though MtrBTN2 transmission presumably occurs by seawater filtering (discussed in Caza et al., 2020), the transport of cancerous cells by marine currents is unlikely to explain such a global distribution on its own. Shipping traffic has been proposed as the most probable explanation, i.e., the transport of cancerous mussels within ballasts or on ship hulls (Skazina et al., 2021; Yonemitsu et al., 2019). If such is the case, we would expect to find a higher prevalence of MtrBTN2 in ports, which have been proposed as possible MtrBTN reservoirs (Skazina et al., 2021). To our knowledge, these claims have remained speculative and no formal evidence of the effect of shipping traffic and port habitat on BTN epidemiology has been provided to date. More

generally, the critical role of vessel biofouling in the translocation and epidemiology of marine pathogens is strongly suspected but still lacks evidence (see Georgiades et al., 2021). Other environmental factors could also affect the epidemiology of BTN2s, such as currents, abiotic environmental variables (e. g., salinity, temperature, pH) or the species host, but little is known about the ecology of marine transmissible cancers.

European mussels are affected by MtrBTN2, and prevalence is much higher in *M. edulis* (on the order of 1/100) than *M. galloprovincialis* (on the order of 1/1000; Hammel et al., 2021). These two host species coexist and can hybridise when they are in contact (Bierne et al., 2003; Coustau et al., 1991; Daguin et al., 2001; Fraïsse et al., 2016; Simon et al., 2021). Associations between genetic backgrounds and environmental variables indicate that environment partly influences the hybrid zone structure and maintenance : *M. edulis* genotypes are more frequent in sheltered habitats under freshwater influence while *M. galloprovincialis* genotypes are more frequent in habitats exposed to wave action and with oceanic salinities (Bierne et al., 2003, 2002). Recently, an admixed lineage of mussels has been found in several commercial French ports (Atlantic Ocean and English Channel; Simon et al., 2020), the “dock mussels”, that have an admixed genome between Mediterranean *M. galloprovincialis* and local *M. edulis*.

To study the relationship between cancer prevalence and the environment, we studied mussel populations in a mosaic hybrid zone of Southern Brittany (France) known to have contrasting environmental factors influencing species distribution. We sampled natural populations as well as mussel farms, floating buoys, one commercial port and 19 marinas. To detect mussels infected with MtrBTN2, we developed and performed a genetic screening method using pooled samples followed by demultiplexed real-time PCR and digital PCR (ddPCR) that amplify one nuclear and two mitochondrial genes with newly designed primers targeting specific variants. We found MtrBTN2 at low prevalence (23/1516), in only nine of the 76 sites of the study area, including seven ports (the commercial port and six of the 19 marinas). Interestingly, one site had a high number of MtrBTN2 cases (8/20) and appeared to be a possible hotspot. Given this site is a landing pier for maritime shuttles with frequent shipping traffic to other ports of the area, it could be a likely source of propagation. A few cancers were found in natural beds close to the hotspot, suggesting a spillover effect, although none were found in sites outside other ports where MtrBTN2 was detected. In addition, mussel farm and buoy samples were all MtrBTN2-free. These observations suggest that ports could be favourable habitats for MtrBTN2

transmission and/or that maritime transport could play a vector role for the spreading of the disease in this area, making ports epidemiological hubs for MtrBTN2 propagation.

Materials and methods

Sampling

We collected 1516 *Mytilus* spp. mussels in 76 sites of the French Atlantic coast from the Bay of Quiberon to Pornic between January and March 2020. For each mussel, shell width (W) and length (L) were measured. We calculated the W/L ratio and used the Kmeans (*kmeans()*, package *stats*, R, R Core Team, 2020) to assign mussels to one of two morphotype clusters (*M. edulis* generally has a more elongated shell than *M. galloprovincialis*). We collected hemolymph from adductor muscle (with a 1 ml syringe, 26G needle) and a piece of mantle; both samples were fixed with 96% ethanol as described in Hammel et al. (2021). DNA extraction was done with the NucleoMag 96 Tissue kit (Macherey-Nagel) in association with a Kingfisher Flex extraction robot. We followed the kit protocol with a modified lysis time 1 hour at 56°C and modified the volumes of some reagents: beads were twice diluted in water, 200 µl of MB3 and MB4, 300 µl of MB5 and 100 µl of MB6.

MtrBTN2 detection

MtrBTN2 detection was performed by real-time PCR targeting one nuclear (Elongation Factor, *EF1 α -i3*) and one mitochondrial (cytochrome c oxidase I) marker (Figure 1). The use of a mitochondrial marker should provide a more sensitive detection because the mitochondrial genome has many more copies compared to the nuclear genome. To design primer pairs (*EF1 α -i3* and *mtCOI-sub*), we used available sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) for *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*, and MtrBTN2. The specificity of both markers was tested using various control samples of *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*, and MtrBTN2 samples (early or late stage). To test the sensitivity, we used positive controls with MtrBTN2 DNA diluted 10X and 100X in *M. edulis* DNA. Amplification of both markers was performed using a three-step cycling stage protocol (95°C for 10 s, 58°C for 20 s, 72°C for 25 s) for 40 cycles. We carried out real-time PCRs using the sensiFAST SyBR No-ROX Kit (Bioline) and the LightCycler 480 Real-Time PCR System. Because MtrBTN2 prevalence is expected to be low (Burioli et al., 2019; Hammel et al., 2021) and the number of samples is high (n = 1516), we chose to pre-screen by pooling 12 samples (pooled screening step; Figure 1) and then demultiplexed positive pools to specifically target cancerous samples (simplex screening step; Figure 1).

Before pooling, DNA concentrations were adjusted to 10 ng/ μ l to have an unbiased representation of each sample in the pool. This allowed us to considerably reduce the cost and time of detection, but we acknowledge that this protocol could result in missing some very early stages of the disease. To partly circumvent this problem, we amplified pools with the same nuclear marker (Elongation Factor) and another mitochondrial marker (Control region described in Yonetmitsu et al., 2019) by digital PCR (ddPCR), a more sensitive method with direct copy number estimation. We also confirmed the final real-time PCR diagnosis with ddPCR (simplex screening step, Figure 1). ddPCR works with the taqman method, requiring primer designs that are different from real-time PCR (two primers and one probe; Table S1). ddPCR was subcontracted to the IAGE company that uses the QIAcuity™. Table S1 presents information on real-time PCR and ddPCR primer pairs and probes.

Real-time PCR results were analysed using the LightCycler480 software. Two parameters were extracted: threshold cycle (CT), obtained by Absolute Quantification analysis using the Second Derivative Maximum method, and melting temperature (T_m), obtained by T_m calling analysis. Positive samples were defined as those with a CT different from zero and a T_m from 77.7 to 79 (according to positive control sample T_m values; see results). ddPCR results were analysed with the QuantaSoft™ Analysis Pro software, which provides the copy number for each sample. Samples were considered as positive when there were more than two copies.

Environmental data

The 76 sampling sites were selected to have contrasting environments and genetic backgrounds (*M. edulis*, *M. galloprovincialis* and hybrids), so several habitat variables were considered: site type (port, natural bed, farm, buoy), population abundance (1: isolated, 2: clustered, 3: beds), wave action (1: exposed, 2: sheltered), sampling depth (1: bottom, 2: intermediate, 3: surface), and sun exposure (1: shaded, 2: semi-shaded, 3: sunny). We also had access to temperature, salinity and current 3D model data collected by different marine stations (we used the closest to each site). 3D current modeling provides great deal of speed, direction, and depth data (water height and bottom). To reduce the data, we performed a PCA and used the two first axes as proxies. For temperature and salinity data, we used averages over several months and years. All information about sites is reported in Table S2.

Statistical analysis: relationship between MtrBTN2 presence and environmental variables

The association of MtrBTN2 presence with each habitat variable was first tested with a Fisher exact test. We used redundancy analysis (RDA) to assess the global relationship between the presence of cancerous mussels and environmental variables. The real-time PCR and ddPCR results of both markers were synthesised to define positive samples: negative samples had 0 and cancerous samples had CT or copy number values (1516 x 4 matrix). All environmental data described above were used as explanatory variables (*rda()* function of the *vegan* package in R; Oksanen et al., 2020). Forward selection using the *ordiR2step()* *vegan* function was then used to determine significance of the variables.

Results

Mitochondrial markers and ddPCR are more effective in detecting MtrBTN2

The design of the *EF1 α -i3* and *mtCOI-sub* primer pairs (real-time PCR) allowed us to amplify a nuclear locus specific to *M. trossulus* hosts and MtrBTN2 and a mitochondrial locus specific to MtrBTN2, respectively (Figure 2A and C). All MtrBTN2 control samples diluted 1/10 and most of those diluted 1/100 were detected, showing good sensitivity for both markers (Figure 2A and C). Cancerous samples that did not amplify with real-time PCR when diluted by 100 appeared positive in ddPCR for both markers, except for one sample for which *EF* was negative (Figure 2B and D). This confirms that ddPCR is a more sensitive method. For all but one sample, the comparison of nuclear and mitochondrial real-time PCR markers showed lower CT values for *mtCOI-sub* (Figure 2E). The same comparison in ddPCR also showed a higher copy number for the mitochondrial marker (mtCR; Figure 2F). Even though both markers and methods seemed to be effective for MtrBTN2 detection, mitochondrial markers and ddPCR showed higher sensitivity. Altogether, this supports the use of both methods and markers in parallel for the pooled detection step (Figure 1), which requires high sensitivity.

MtrBTN2 screening

We amplified nuclear and mitochondrial markers using real-time PCR (*EF1 α -i3*, *mtCOI-sub*) and ddPCR (*EF*, *mtCR*) to detect the presence of MtrBTN2 in the 1516 mussels sampled from the 76 sites of the study area (Figure 1).

The pooled screening step using real-time PCR revealed 16/127 positive pools: 4/127 with *EF1 α -i3* (all with low CT, less than 29.5), 9/127 with *mtCOI-sub* (mostly with high CT), and 3/127 were positive for

both markers (Figure 2E). All *EF1 α -i3* positive pools were also found to be positive by ddPCR *EF* (Figure 2B). In addition, four pools were only detected by ddPCR (copy number less than five), confirming the higher sensitivity of this method. For the mitochondrial marker, all but three positive pools were also positive for ddPCR *mtCR* (Figure 2D) and eight additional pools showed positive results with the ddPCR method (copy number less than seven). Even though the two methods did not target the same gene, ddPCR appeared once again more sensitive. Altogether, both amplification methods showed comparable results except for high CT / low copy number values, for which a pool can be positive for one method and negative for the other (Figure 2B and D). To be sure to maximize cancer detection during the simplex screening step, we choose to keep pools positive for at least one method and gene, which corresponds to 28 positive pools of 12 samples.

We did the simplex screening step using real-time PCR and then confirmed the diagnosis by ddPCR. A total of 45/336 samples were positive, 15 with *EF1 α -i3* only, 25 with *mtCOI-sub* only, and 5 with both markers. Since mitochondrial markers were expected to be more sensitive than nuclear markers, we did not expect to observe samples positive for *EF1 α -i3/EF* but not for *mtCOI-sub/mtCR*. We suspect that some host alleles that were present at low frequencies in populations of 'dock mussels' (the hybrid lineage found in Saint Nazaire port) can sometimes amplify with *EF1 α -i3*. This could be explained by shared polymorphism between host species rather than due to the presence of MtrBTN2. The 15 samples that were positive for *EF1 α -i3* only were considered to be false positives. For the 30 other samples, we performed ddPCR with both markers to confirm the real-time mitochondrial PCR diagnosis. For 23/30 samples, ddPCR *mtCR* confirmed the real-PCR *mtCOI-sub* diagnosis. For 10/25 samples positive for *mtCOI-sub* only, ddPCR revealed a few copies of *EF*. Finally, we considered all samples that showed as positive for mitochondrial markers with the two methods to be cancerous samples. We found 23 positive samples from 9 sites in which the number of cases varied from 1 to 8 (Figure 3). The highest proportion of cancerous samples was found at site P20 (Croisic Pier), and the next highest were near this site (P19, P21, and P23; Figure 3).

MtrBTN2 infected mussels are mostly found in ports

After the MtrBTN2 detection step, which revealed 23 individuals infected by this transmissible cancer, we studied associations with environmental factors. Most of the cancerous samples were found in 7 ports (16/23) (Figure 3), otherwise in 2 natural beds (7/23) close to Croisic pier (P20). MtrBTN2 was not detected in the 180 individuals from the 9 sampled mussel farms or in the 140 individuals from the 7

floating buoys. Cancerous sample distributions among site types were significantly different from healthy ones (Fisher exact test, p-value = 0.0001). Among the 9 environmental variables included in RDA analysis (Figure 4), 3 appeared to be significant in explaining cancer presence: *sun_exposure*, *current* (direction), and *salinity* (Table 1). Despite a p-value close to 0.05, *site type* was not significant (Table1) because of a strong correlation among all variables. However, when we transformed *site type* into a binary variable (port, other) in the RDA, the effect became significant (p-value=0.01).

MtrBTN2 hosts mostly have an elongated shell, like M. edulis

Shell morphology is not a perfect proxy for species determination, but it nonetheless provides an indication. *M. edulis* has a more elongated shell than *M. galloprovincialis* with hybrids in between. Most cancerous individuals have a low W/L ratio (elongated shell), which could indicate that hosts are mostly *M. edulis* (Figure 5), as expected (Hammel et al. 2021). However, three individuals (13%) showed a higher W/L ratio and could be *M. galloprovincialis*.

Discussion

Little is known about the ecology of MtrBTN2 and its affected hosts or about the possible environmental factors that could explain the epidemiology of this transmissible cancer. Here, we investigated the presence of MtrBTN2 in a survey area that has contrasting natural and anthropogenic habitats and a mosaic distribution of *M. edulis* and *M. galloprovincialis*. We detected MtrBTN2 at low prevalence but mostly in ports. We discuss this result, which indicates that ports are the likely epidemiological hubs for parasite propagation.

Most of the mussels affected by MtrBTN2 were found in ports. The highest prevalence of MtrBTN2 in ports could be explained by two non-exclusive hypotheses: a favourable environment (more stressful and prone to disease development) or enhanced propagation (higher population density in a confined area or enhanced connectivity among ports because of maritime traffic). Indeed, ports are often polluted, confined, permanently immersed habitats (no tidal constraint) that have a high density of mussels, and they are connected via vessel biofouling to other sites by maritime traffic (other ports or wild sites).

Pollution is a major environmental stressor that could affect host physiology and increase its susceptibility to parasites, particularly by altering the immune response; this has been shown in several bivalve mollusc species (Canesi et al., 2015; Galloway & Depledge, 2001; Girón-Pérez, 2010; Renault, 2015). However, most of the affected individuals (15/23) were found in three open sea sites in which pollution has not been recorded (Croisic Pier, Natural beds 19 and 21; Figure 3) and this suggests that pollution alone cannot explain the higher prevalence of MtrBTN2 cancers in ports. Croisic Pier is different from other port environments since it is not an enclosed port but a floating pier in a lagoon channel that is affected by the strong tidal currents that fill and empty Guerande lagoon at each tide. In addition, Guerande lagoon is known to be a healthy ecosystem with salt farms and a rich flora and fauna under special protection (Natura 2000 area). The pier itself, where mussels were sampled, was covered with encrusting marine organisms and surrounded by a luxurious diversity of marine species including kelps, ophiuroids, crabs, and many fishes. Moreover, we found no clear association between cancer presence and the environmental variables we used. Although sun exposition correlated well, it was highly associated to ports.

Ports are often confined areas with long particle residence times that could enhance contact times between parasites and hosts, increasing the probability of transmission and promoting parasite persistence. However, the major hotspot on Croisic Pier, which is affected by strong tidal currents, again provides evidence against this hypothesis given that it is not a confined place.

Host population density is also an important epidemiological parameter since high density can favour parasite persistence in host populations (Bommarito et al., 2021; Hopkins et al., 2020; Thieltges, 2007). However, we did not find evidence of MtrBTN2 cases on floating buoys or in mussel farms despite high mussel population density in these sites. This suggests that high density alone cannot fully explain higher MtrBTN2 prevalence in ports either.

Connectivity by maritime traffic appears to be the main link between affected ports: this parameter appears to adequately explain cancer distribution in the studied area. We can imagine that some hotspots exist at some places along the coast either because of environmental factors that remain to be characterised, or simply because of stochastic local outbreaks. If a port is affected by such a local outbreak, it will become a source of contamination to other ports via vessel biofouling, while natural beds likely remain isolated by density troughs that could halt the propagation. While this does not disqualify the factors discussed above —pollution, containment, and population density— as enhancers

of contamination within ports, this study suggests that ports could be anthropogenic gateways to pathogen propagation. This result represents a significant advance in our understanding of MtrBTN2 epidemiology both by implicating ports as epidemiological hubs and by suggesting that the natural propagation of this transmissible cancer could be naturally halted by density troughs in the distribution of mussel hosts. Indeed, given that *M. galloprovincialis* seems more resistant to MtrBTN2, patches of *M. galloprovincialis* could represent barriers to disease propagation between patches of *M. edulis*. Under this hypothesis, ports and shipping traffic would be anthropogenic gateways that favour connection between patches of host populations. This would also tend to suggest that BTN naturally spreads progressively from host to host by close contact rather than drifting with currents.

Croisic Pier, which has the highest cancer prevalence (8/20), seems to represent a hotspot of MtrBTN2 prevalence and a possible source for other ports. Indeed, this pier is frequently used by maritime shuttles and shipping traffic to many ports in the studied area. In particular, this pier is the departure site of boats going to Hoedic, an isolated island for which cancer presence is most likely via anthropogenic transport. MtrBTN2 is also found in foreshores close to Croisic. This reveals possible spillover from ports to local mussel populations. Maritime traffic has been identified as a source of non-indigenous and invasive species imports, including their expansion from commercial ports to natural populations *via marinas* (Floerl et al., 2009; Murray et al., 2011; Ulman et al., 2017). It has also been documented that ship biofouling could introduce parasites to unaffected areas and have secondary impacts on local populations, including causing significant mortality (see Georgiades et al., 2021). In our study, when sites outside standard enclosed ports (e.g., confined marinas) were sampled, MtrBTN2 was never detected, suggesting that contagion remains confined to the port area. This suggests that spillover could depend on how confined a port is.

Conclusion

Our study reveals that the prevalence of MtrBTN2 is low, but that most impacted sites are ports (marinas, commercial port, and shuttle piers). This result suggests that ports are epidemiological hubs and anthropogenic gateways for MtrBTN2 propagation. Detection of MtrBTN2 presence on boat biofouling would provide more direct evidence of its vector role. It would also be interesting to investigate whether prevalence hotspots are more commonly localised in areas with particular environmental conditions or whether they are stochastic local outbreaks. This could be done by detecting new hotspots or by sampling Croisic Pier again in the future. The spreading of (micro)parasites

and pathogens by vessel biofouling is a valid concern, and results such as those of our study, i.e., at a smaller scale than translocations identified in the marine bioinvasion literature or by Yonemitsu et al. (2019), highlight the necessity of political regulation to limit the effects of biofouling in addition to ballast water control.

REFERENCES

- Baez-Ortega, A., Gori, K., Strakova, A., Allen, J. L., Allum, K. M., Bansse-Issa, L., ... Murchison, E. P. (2019). Somatic evolution and global expansion of an ancient transmissible cancer lineage. *Science*, 365(6452). <https://doi.org/10.1126/science.aau9923>
- Bierne, N., Borsa, P., Daguin, C., Jollivet, D., Viard, F., Bonhomme, F., & David, P. (2003). Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Molecular Ecology*, 12(2), 447–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01730.x>
- Bierne, N., Bonhomme, F., & David, P. (2003). Habitat preference and the marine-speciation paradox. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1522), 1399–1406. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2003.2404>
- Bierne, N., David, P., Langlade, A., & Bonhomme, F. (2002). Can habitat specialisation maintain a mosaic hybrid zone in marine bivalves? *Marine Ecology Progress Series*, 245, 157–170. <https://doi.org/10.3354/MEPS245157>
- Bommarito, C., Thieltges, D. W., Pansch, C., Barboza, F. R., Pranovi, F., & Wahl, M. (2021). Effects of first intermediate host density, host size and salinity on trematode infections in mussels of the southwestern Baltic Sea. *Parasitology*, 148(4), 486–494. <https://doi.org/10.1017/S0031182020002188>
- Burioli, E. A. V., Trancart, S., Simon, A., Bernard, I., Charles, M., Oden, E., ... Houssin, M. (2019). Implementation of various approaches to study the prevalence, incidence and progression of disseminated neoplasia in mussel stocks. *Journal of Invertebrate Pathology*, 168(April), 107271. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107271>
- Canesi, L., Ciacci, C., Bergami, E., Monopoli, M. P., Dawson, K. A., Papa, S., ... Corsi, I. (2015). Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Marine Environmental Research*, 111, 34–40. <https://doi.org/10.1016/J.MARENRES.2015.06.008>

- Caza F, Bernet E, Veyrier FJ, Betoulle S, St-Pierre Y. Hemocytes released in seawater act as Trojan horses for spreading of bacterial infections in mussels. *Sci Rep.* 2020 Nov 12;10(1):19696. doi: 10.1038/s41598-020-76677-z. PMID: 33184419; PMCID: PMC7665017.
- Coustau, C., Renaud, F., & Delay, B. (1991). Genetic characterization of the hybridization between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on the Atlantic coast of France. *Marine Biology*, 111(1), 87–93. <https://doi.org/10.1007/BF01986350>
- Daguin, C., Bonhomme, F., & Borsa, P. (2001). The zone of sympatry and hybridization of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*, as described by intron length polymorphism at locus *mac-1*. *Heredity* 2001, 86(3), 342–354. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00832.x>
- Floerl, O., Inglis, G. J., Dey, K., & Smith, A. (2009). The importance of transport hubs in stepping-stone invasions. *Journal of Applied Ecology*, 46(1), 37–45. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2664.2008.01540.X>
- Fraïsse, C., Belkhir, K., Welch, J. J., & Bierne, N. (2016). Local interspecies introgression is the main cause of extreme levels of intraspecific differentiation in mussels. *Molecular Ecology*, 25(1), 269–286. <https://doi.org/10.1111/mec.13299>
- Galloway, T. S., & Depledge, M. H. (2001). Immunotoxicity in invertebrates: Measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 2001 10:1, 10(1), 5–23. <https://doi.org/10.1023/A:1008939520263>
- Garcia-Souto, D., Bruzos, A. L., Diaz, S., Rocha, S., Pequeño, A., Roman-Lewis, C. F., ... Tubio, J. M. C. (2021). Mitochondrial genome sequencing of marine leukemias reveals cancer contagion between clam species in the Seas of Southern Europe. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.03.10.434714>
- Georgiades, E., Scianni, C., Davidson, I., Tamburri, M. N., First, M. R., Ruiz, G., ... Kluza, D. (2021). The role of vessel biofouling in the translocation of marine pathogens: Management considerations and challenges. *Frontiers in Marine Sciences*, 8(660125). <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.660125>
- Girón-Pérez, M. I. (2010). Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution. *ISJ*, 7, 149–156.
- Hammel, M., Simon, A., Arbiol, C., Villalba, A., Burioli, E. A. V., Pépin, J.-F., ... Bierne, N. (2021). Prevalence and polymorphism of a mussel transmissible cancer in Europe. *Molecular Ecology*, 31(3), 736–751.

<https://doi.org/10.1111/MEC.16052>

Hopkins, S. R., Fleming-Davies, A. E., Belden, L. K., & Wojdak, J. M. (2020). Systematic review of modelling assumptions and empirical evidence: Does parasite transmission increase nonlinearly with host density? *Methods in Ecology and Evolution*, *11*(4), 476–486.

<https://doi.org/10.1111/2041-210X.13361>

Metzger, M. J., Reinisch, C., Sherry, J., & Goff, S. P. (2015). Horizontal transmission of clonal cancer cells causes leukemia in soft-shell clams. *Cell*, *161*(2), 255–263.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.042>

Metzger, M. J., Villalba, A., Carballal, M. J., Iglesias, D., Sherry, J., Reinisch, C., ... Goff, S. P. (2016). Widespread transmission of independent cancer lineages within multiple bivalve species. *Nature*, *534*(7609), 705–709. <https://doi.org/10.1038/nature18599>

Murgia, C., Pritchard, J. K., Kim, S. Y., Fassati, A., & Weiss, R. A. (2006). Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*, *126*(3), 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.051>

Murray, C. C., Pakhomov, E. A., & Therriault, T. W. (2011). Recreational boating: a large unregulated vector transporting marine invasive species. *Diversity and Distributions*, *17*(6), 1161–1172.

<https://doi.org/10.1111/J.1472-4642.2011.00798.X>

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., ... Maintainer, H. W. (2020). Package “vegan” - Community Ecology Package Version 2.5-7.

Pearse, A. M., & Swift, K. (2006). Allograft theory: Transmission of devil facial-tumour disease. *Nature*, *439*(7076), 549. <https://doi.org/10.1038/439549a>

Pye, R. J., Pemberton, D., Tovar, C., Tubio, J. M. C., Dun, K. A., Fox, S., ... Woods, G. M. (2016). A second transmissible cancer in Tasmanian devils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(2), 374–379. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519691113>

R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. Retrieved from <http://www.r-project.org/index.html>

Rebbeck, C. A., Thomas, R., Breen, M., Leroi, A. M., & Burt, A. (2009). Origins and evolution of a transmissible cancer. *Evolution*, *63*(9), 2340–2349. <https://doi.org/10.1111/j.1558->

5646.2009.00724.x

- Renault, T. (2015). Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. *Fish & Shellfish Immunology*, *46*(1), 88–93. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2015.04.011>
- Simon, A., Arbiol, C., Nielsen, E. E., Couteau, J., Sussarellu, R., Burgeot, T., ... Bierne, N. (2020). Replicated anthropogenic hybridisations reveal parallel patterns of admixture in marine mussels. *Evolutionary Applications*, *13*(3), 575–599. <https://doi.org/10.1111/eva.12879>
- Simon, A., Fraïsse, C., El Ayari, T., Liautard-Haag, C., Strelkov, P., Welch, J. J., & Bierne, N. (2021). How do species barriers decay? Concordance and local introgression in mosaic hybrid zones of mussels. *Journal of Evolutionary Biology*, *34*(1), 208–223. <https://doi.org/10.1111/jeb.13709>
- Skazina, M., Odintsova, N., Maiorova, M., Ivanova, A., Väinölä, R., & Strelkov, P. (2021). First description of a widespread *Mytilus trossulus*-derived bivalve transmissible cancer lineage in *M. trossulus* itself. *Scientific Reports*, *11*(5809). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85098-5>
- Thieltges, D. W. (2007). Habitat and transmission – effect of tidal level and upstream host density on metacercarial load in an intertidal bivalve. *Parasitology*, *134*(4), 599–605. <https://doi.org/10.1017/S003118200600165X>
- Ulman, A., Ferrario, J., Occhpinti-Ambrogi, A., Arvanitidis, C., Bandi, A., Bertolino, M., ... Marchini, A. (2017). A massive update of non-indigenous species records in Mediterranean marinas. *PeerJ*, *5*(10), e3954. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.3954>
- Yonemitsu, M. A., Giersch, R. M., Polo-Prieto, M., Hammel, M., Simon, A., Cremonte, F., ... Metzger, M. J. (2019). A single clonal lineage of transmissible cancer identified in two marine mussel species in South America and Europe. *ELife*, *8*. <https://doi.org/10.7554/eLife.47788>

MAIN FIGURES AND TABLES

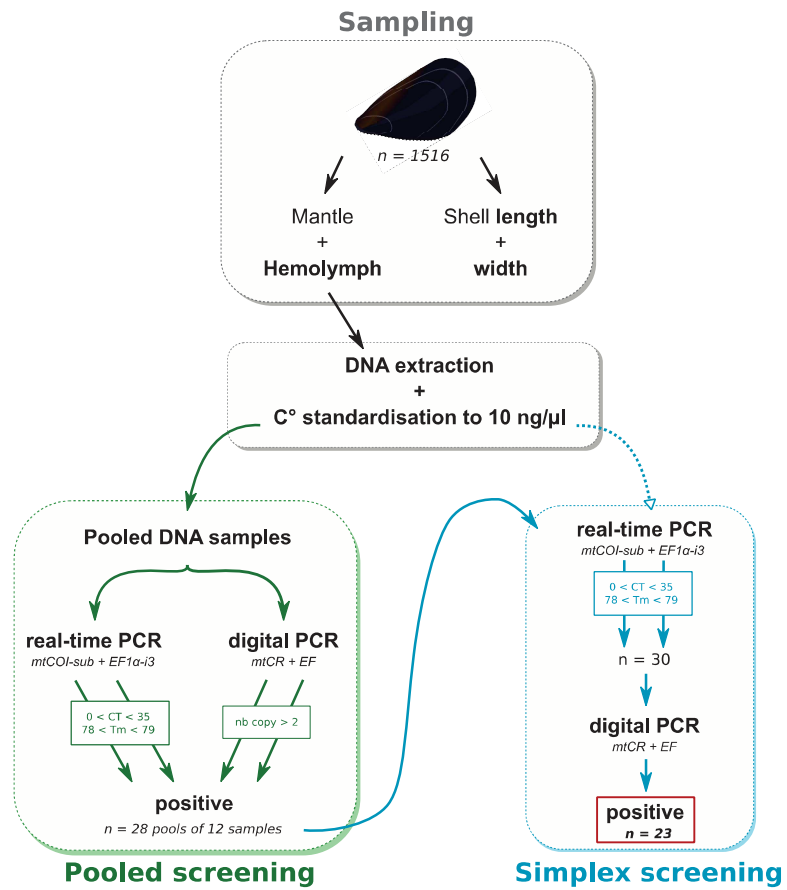


Figure 1: Experimental design diagram, from sampling to genetic diagnosis.

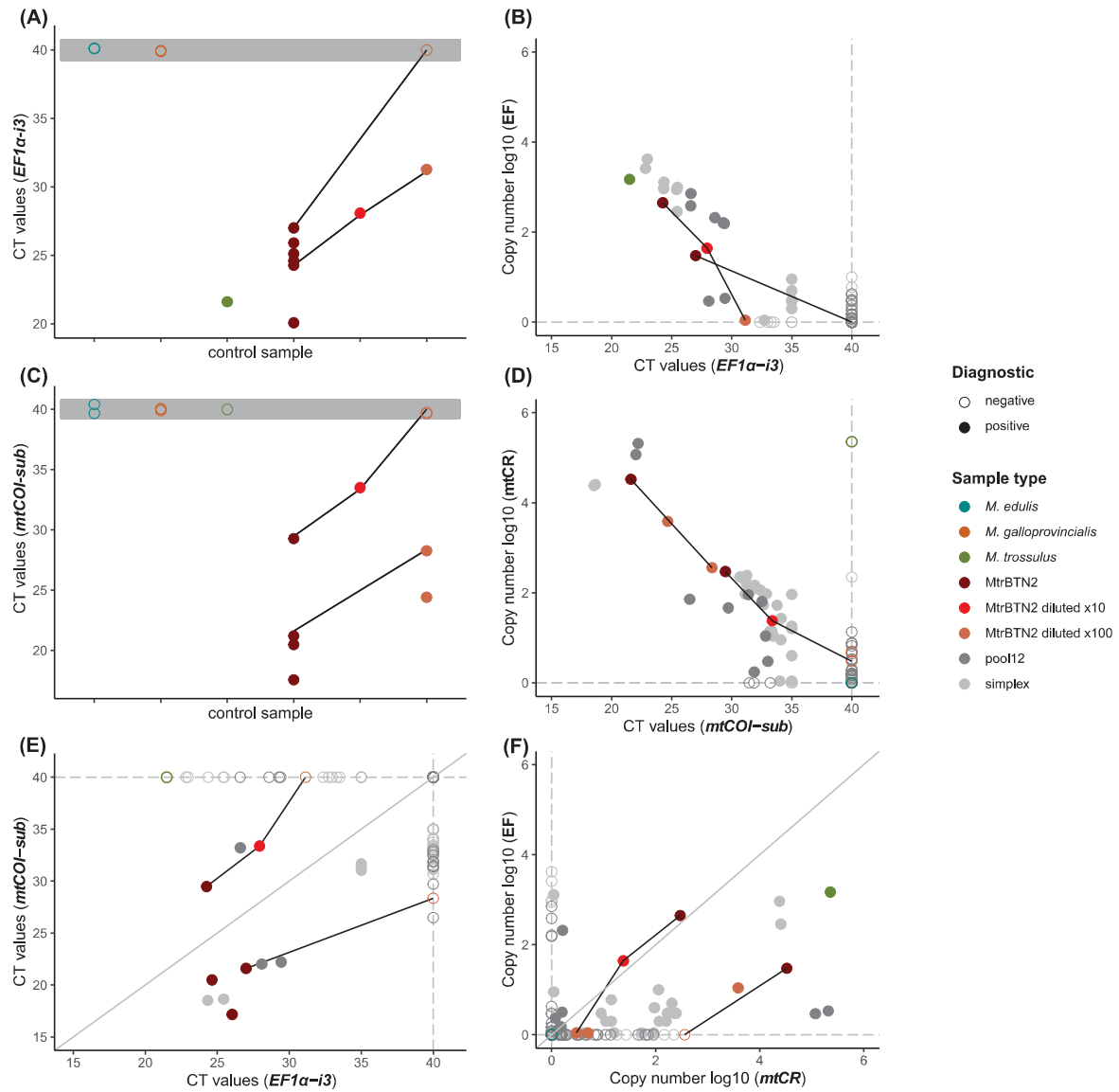


Figure 2: Real-time PCR and digital PCR results. (A) and (C) represent real-time PCR results of *EF1 α -i3* and *mtCOI-sub* of all control samples. (B) and (D) correspond to correlation plots between PCR amplification methods for nuclear and mitochondrial markers, respectively. (E) and (F) represent correlation plots between nuclear and mitochondrial markers within each PCR amplification method. Dotted lines (B, D, E, F) and grey area (A, C) correspond to the negative thresholds, 0 for no DNA copy detected by ddPCR and 40 for no amplification in real-time PCR. Solid lines in each graph relate to the same sample diluted to different concentrations.

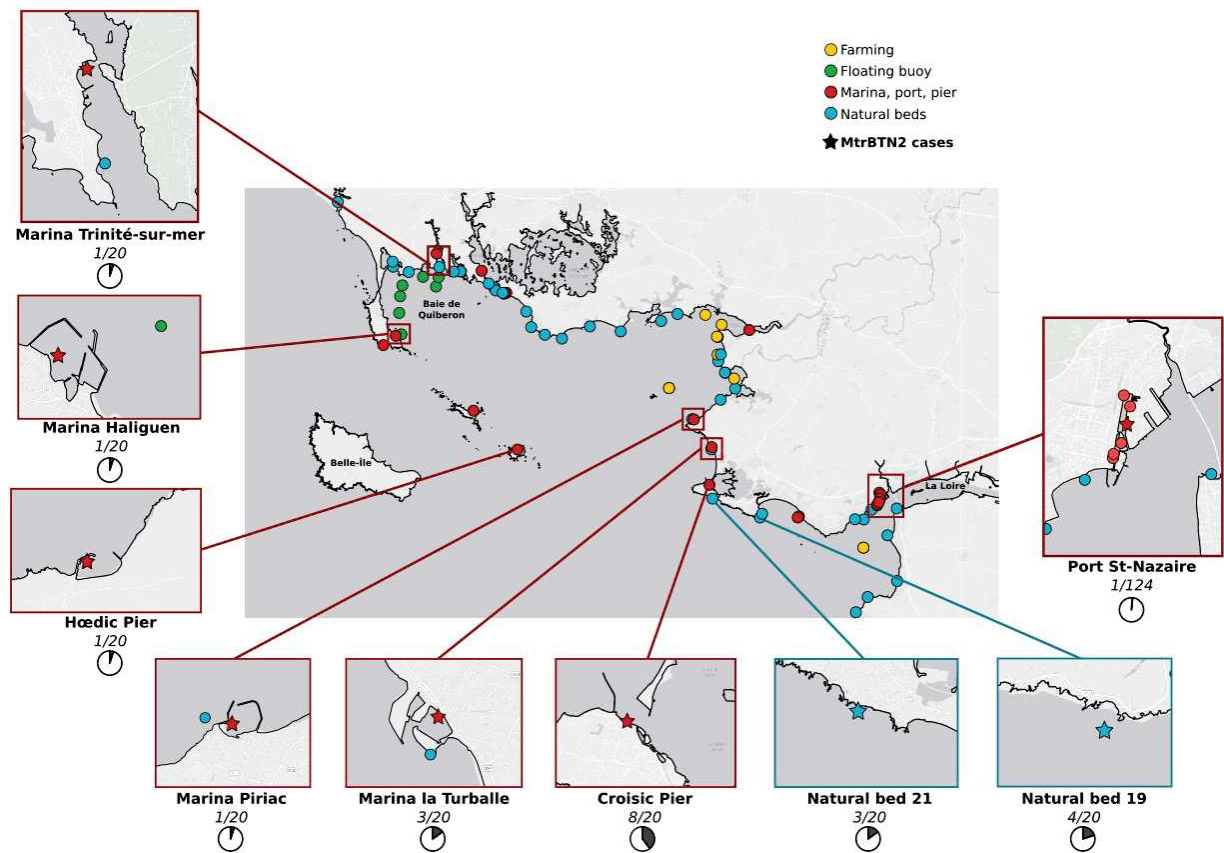


Figure 3: Location of sampling sites. Zoomed sites correspond to sites with mussels affected by MtrBTN2. Pie graphs and numbers in italics correspond to the proportion of cancerous samples of each site. Coloured points represent the site type, as shown in the figure legend. Map origin: Ersi gray (light).

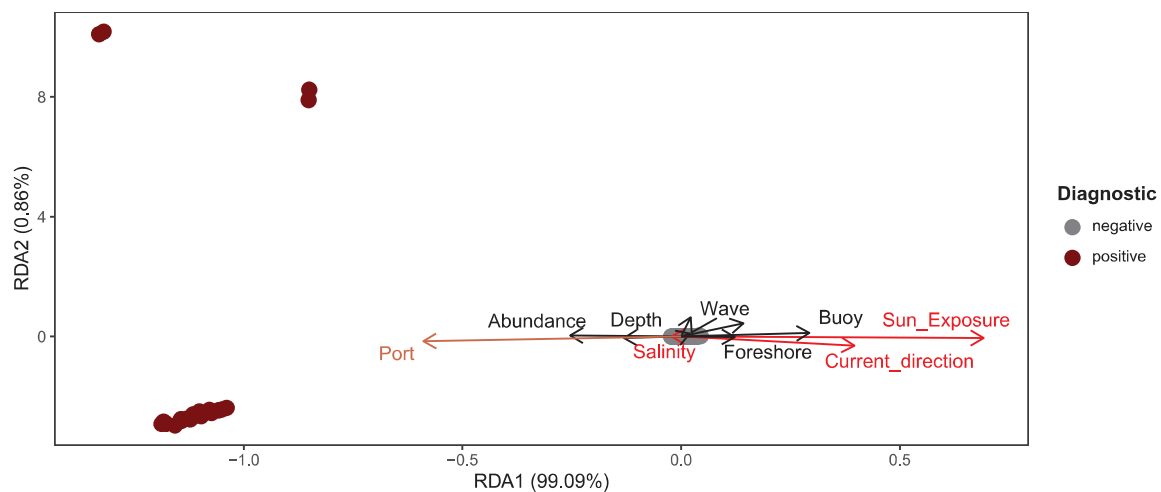


Figure 4: RDA analysis to assess global relationship between the presence of MtrBTN2 affected mussels and environmental factors. Points correspond to mussel individuals and arrow represent environmental variables. Red arrows correspond to significant variables obtained by forward selection with the ordiR2step() function (R software).

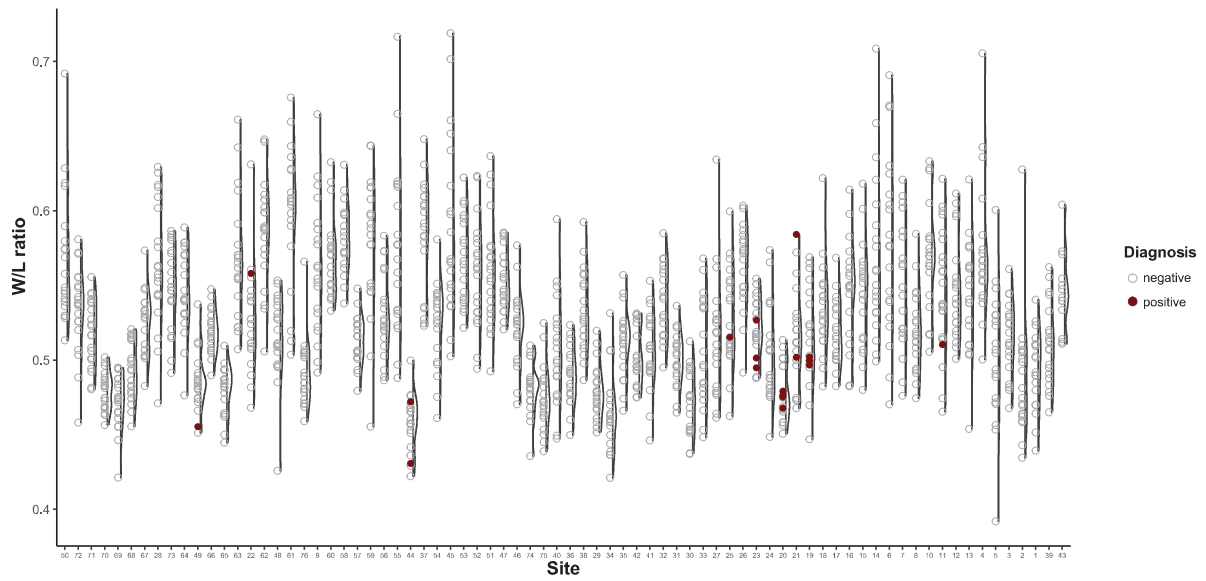


Figure 5: Shell morphology of mussels affected by MtrBTN2. Representation of individual shell weight/length ratio for each sampled sites. Red points correspond to mussels affected by MtrBTN2 and grey points represent MtrBTN2-free mussels.

Table 1: Forward selection of RDA environmental variables. R2.adj and p-value correspond to *ordiR2step()* test results.

variable	p-value	R2.adj
<i>Sun_exposure</i>	0.002	0.0143
<i>Current_direction</i>	0.012	0.0187
<i>Salinity</i>	0.042	0.0204
<i>Site_type</i>	0.066	-

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table S1: Primer and probe sequences used in real-time PCR and digital PCR.

Locus	Primer	Amplicon length	Method
EF1α-i3	<i>EF1α-i3-F: 5'-GGTGATGCACACCACATTCATTTAG</i>	210	real-time PCR
	<i>EF1α-i3-R: 5'-TCTGGATTTCCATGAATCGGGAC</i>		
mtCOI-sub	<i>MtCOI-sub-F: 5'-GGTTAATGATCCGAATGCAACTG</i>	113	real-time PCR
	<i>MtCOI-sub-R: 5'-CACAGCAAAAAAAAAATTATTATTAAGGCA</i>		
EF	<i>EF-F: 5'-GTCTGCTAAACTGTTATATCGTTTG</i>	151	ddPCR
	<i>probe : GTTCGGTAGTTCTGTCAGGTAGTTTGGGAT</i>		
	<i>EF-R: 5'-GCTTGTAATATAGTTAATGCATGTTGT</i>		
mtCR	<i>MtCR-F: 5'-AGAATGAGGCTTTATGGCGT</i>	79	ddPCR
	<i>probe : TTCCTTGCCACAGGTAGAGACAATGACCAT</i>		
	<i>MtCR-R: 5'-AAAAGACAGGTGGAAAGGGG</i>		

Table S2: Geographical coordinates and environmental factors measured at sample sites.

Site	Latitude	Longitude	Site type	Wave action	Sampling depth	Sun exposure	Population abundance	Temperature	Salinity	Current velocity	Current direction
55	47,54215	-2,89603	Port	Sheltered		Sunny	Beds	12,42	32,38	-602,76	131,77
56	47,54126	-2,89936	Port	Sheltered		Sunny	Beds	12,42	32,38	-602,76	131,77
9	47,56987	-2,94217	Port	Sheltered		Shaded	Clustered	12,50	31,85	-535,10	34,27
14	47,25548	-2,22748	Natural bed	Exposed	Intermediate	Shaded	Clustered	12,76	19,27	-859,11	-255,85
15	47,25567	-2,24388	Natural bed	Exposed	Surface	Shaded	Clustered	12,76	19,27	-1030,81	-131,52
4	47,26934	-2,16576	Natural bed	Sheltered	Intermediate	Semi-shaded	Isolated	12,89	15,70	-1133,37	-166,17
6	47,26789	-2,21293	Natural bed	Exposed	Intermediate	Sunny	Isolated	12,89	15,70	-976,51	195,70
7	47,273427	-2,202455	Port	Sheltered		Sunny	Beds	12,89	15,70	-830,10	-293,07
8	47,274448	-2,202175	Port	Sheltered		Sunny	Beds	12,89	15,70	-830,10	-293,07
10	47,27721	-2,19934	Port	Sheltered		Sunny	Beds	12,89	15,70	-830,10	-293,07
11	47,28145	-2,19727	Port	Sheltered		Semi-shaded	Beds	12,89	15,70	-830,10	-293,07
12	47,28646	-2,19602	Port	Sheltered		Shaded	Beds	13,71	18,97	-830,10	-293,07

13	47,28926	-2,19834	Port	Sheltered		Sunny	Beds	13,71	18,97	-830,10	-293,07
5	47,23532	-2,18319	Natural bed	Exposed	Intermediate	Shaded	Clustered	13,90	20,15	-714,43	-106,75
50	47,65654	-3,21113	Natural bed	Sheltered			Isolated	13,91	34,18		
27	47,40705	-2,49517	Natural bed	Exposed	Bottom	Shaded	Beds	14,11	30,88	-802,86	-386,10
33	47,42115	-2,46793	Natural bed	Exposed	Intermediate	Shaded	Beds	14,11	30,88	-723,35	-326,85
44	47,34406833	-2,875136667	Port	Sheltered			Beds	14,50	33,23	-1190,32	-113,43
76	47,39319667	-2,95748	Port	Sheltered			Beds	14,50	33,23	-1291,71	-187,98
68	47,53768333	-3,094516667	Buoy	Sheltered		Sunny	Beds	14,73	33,55	-1197,09	582,66
69	47,51676667	-3,096383333	Buoy	Sheltered		Sunny	Beds	14,73	33,55	-955,49	362,33
70	47,48965	-3,092366667	Buoy	Sheltered		Shaded	Beds	14,73	33,55	-694,90	81,51
71	47,487869	-3,102664	Port	Sheltered		Sunny	Isolated	14,73	33,55	-775,40	305,72
72	47,47612	-3,126184	Port	Sheltered		Sunny	Isolated	14,73	33,55	-978,81	-133,81
20	47,29932	-2,51617	Port	Sheltered		Semi-shaded	Beds	15,07	31,98	-1253,69	-118,25
41	47,4218	-2,5917	Farmin g	Sheltered		Sunny	Beds	15,16	32,01	-779,96	-308,78
42	47,4218	-2,5917	Farmin g	Sheltered		Shaded	Beds	15,16	32,01	-779,96	-308,78
16	47,257903	-2,350942	Port	Sheltered		Shaded	Beds	15,30	28,64	-1200,57	-93,37
17	47,259208	-2,348839	Port	Sheltered			Beds	15,30	28,64	-1200,57	-93,37
18	47,26263	-2,41755	Natural bed	Sheltered	Surface		Beds	15,30	28,64	-801,19	317,32
19	47,25794	-2,42153	Natural bed	Exposed	Intermediate	Shaded	Beds	15,30	28,64	-938,01	-154,18
43	47,13757	-2,24218	Natural bed	Sheltered	Bottom		Isolated	15,38	31,69	-1000,20	320,73
28	47,57504	-3,107527	Natural bed	Sheltered	Intermediate	Shaded	Isolated	16,45	34,19	-149,03	191,43
73	47,58148	-3,108584	Natural bed		Intermediate	Sunny	Isolated	16,45	34,19	-96,51	126,44
48	47,5691	-2,98195	Natural bed	Sheltered	Intermediate		NA	16,65	34,21	-566,38	18,94
61	47,5691	-2,98195	Natural bed	Sheltered	Intermediate	Sunny	NA	16,65	34,21	-566,38	18,94
62	47,568805	-2,99446	Natural bed	Sheltered	Intermediate	Shaded	Isolated	16,65	34,21	-627,42	309,12
74	47,51435	-2,523716667	Farmin g	Sheltered		Sunny	Beds	16,84	31,23	-774,37	-366,47
57	47,54503	-2,91557	Natural bed	Exposed	Intermediate	Sunny	Beds	16,90	33,03	-1256,82	357,04

58	47,5487	-2,9189	Natural bed	Exposed	Intermediate	Sunny	Isolated	16,90	33,03	-629,90	-243,16
59	47,54206	-2,90289	Natural bed	Exposed	Intermediate	Shaded	Isolated	16,90	33,03	-602,76	131,77
60	47,55387	-2,928765	Natural bed	Exposed	Surface	Sunny	Isolated	16,90	33,03	-666,51	-218,27
75	47,50183333	-2,493333333	Farmin g	Sheltered			Beds	16,93	31,34	-915,05	-403,23
29	47,46449	-2,494863	Natural bed	Exposed	Intermediate	Sunny	Isolated	17,03	32,51	-781,85	-316,34
34	47,4641	-2,5009	Farmin g	Sheltered		Semi-shaded	Beds	17,03	32,51	-781,85	-316,34
35	47,455835	-2,499533	Natural bed	Exposed	Intermediate	Semi-shaded	Isolated	17,03	32,51	-1155,87	23,28
25	47,38212	-2,54513	Port	Sheltered		Semi-shaded	Beds	17,10	31,93	-948,39	-303,62
22	47,59161667	-3,0265	Port	Sheltered		Semi-shaded	Clustered	17,15	34,05	-883,64	116,03
30	47,43389	-2,46989	Farmin g	Sheltered	Bottom	Sunny	Beds	17,31	32,79	-812,05	-320,03
49	47,5623	-3,0519	Buoy	Sheltered		Shaded	Beds	17,70	34,10	-970,12	110,01
63	47,57454	-3,021296	Natural bed	Sheltered	Intermediate	Shaded	Isolated	17,70	34,10	-936,24	331,73
65	47,56183333	-3,0228	Buoy	Sheltered		Sunny	Beds	17,70	34,10	-1217,63	114,06
66	47,55	-3,02745	Buoy	Sheltered		Sunny	Beds	17,70	34,10	-970,43	-30,27
37	47,51846	-2,85862	Natural bed	Exposed	Intermediate	Sunny	Isolated	17,80		-1104,67	206,73
45	47,48921	-2,824	Natural bed	Exposed	Surface		Beds	17,80		-1068,35	69,25
53	47,48437	-2,79206	Natural bed	Exposed	Intermediate	Sunny	Beds	17,80		-930,22	-2,74
54	47,4988	-2,8494	Natural bed	Exposed	Intermediate		Beds	17,80		-1269,20	296,17
26	47,38245	-2,54827	Natural bed	Exposed	Intermediate	Shaded	Isolated	17,99	31,17	-948,39	-303,62
2	47,2196	-2,22818	Farmin g	Sheltered	Bottom	Sunny	Beds	18,07	26,90	-749,11	-309,21
3	47,2196	-2,22818	Farmin g	Sheltered	Bottom	Sunny	Beds	18,07	26,90	-749,11	-309,21
1	47,17725	-2,16503	Natural bed	Sheltered	Intermediate	Shaded	Beds	18,44	32,64	-733,93	157,09
39	47,15693	-2,22018	Natural bed		Bottom	Sunny	Isolated	18,44	32,64	-1128,89	129,49
64	47,568352	-3,078541	Natural bed	Exposed	Intermediate	Sunny	Isolated	18,50	34,10	-714,37	74,24
67	47,55146667	-3,090416667	Buoy	Sheltered		Sunny	Beds	18,50	34,10	-1046,93	523,53
51	47,49342	-2,68219	Natural bed	Exposed	Bottom	Sunny	Beds	18,70		-1028,33	-12,23
52	47,49967	-2,73974	Natural bed	Exposed	Bottom	Sunny	Beds	18,70		-914,16	-84,74
46	47,51539	-2,57585	Natural bed	Exposed	Intermediate		Beds	18,75	32,68	-1337,84	250,49
47	47,50656	-2,60649	Natural bed	Exposed	Intermediate		Beds	18,75	32,68	-926,51	49,62

31	47,4412 4	- 2,48636 2	Natural bed	Exposed	Intermedi ate	Sunny	Clustered		19,69	30,9 6	-1218,28	53,13
32	47,4414 14	- 2,48720 3	Natural bed	Exposed	Intermedi ate	Sunny	Isolated		19,69	30,9 6	-1218,28	53,13
21	47,2819 1	-2,51042	Natural bed	Exposed	Intermedi ate	Semi- shaded	Beds		20,00	31,3 0	-974,34	-228,73
23	47,3471 3	-2,51168	Port	Sheltere d		Sunny	Beds		20,15	31,4 5	-1360,54	117,71
24	47,3443 2	-2,51256	Natural bed	Exposed	Intermedi ate	Semi- shaded	Beds		20,15	31,4 5	-1360,54	117,71
40	47,4950 89	- 2,44155 7	Port	Sheltere d		Semi- shaded	Isolated		20,50	19,7 0	-980,11	-218,93
36	47,4868 7	-2,50209	Farmin g	Sheltere d	Intermedi ate	Sunny	Beds		21,00	33,7 0	-1404,40	468,45
38	47,4863 37	-2,50031	Natural bed	Exposed	Intermedi ate	Sunny	Isolated		21,00	33,7 0	-1404,40	468,45

--- Chapitre 3 ---

**Caractérisation de la réponse anticancéreuse
chez les moules *Mytilus* : combinaison d'histopathologie
et de transcriptomique.**

Au démarrage de la compréhension d'un système complexe...

1. Introduction, contexte et objectifs

Dans tout système d'interaction, la compréhension de l'implication de chacun des protagonistes est essentielle pour pouvoir comprendre l'ensemble du système et sa dynamique. Une question importante dans le cadre des cancers transmissibles est de savoir comment ils arrivent à s'établir et persister dans un nouvel hôte. Pour cela plusieurs paramètres doivent être évalués, tels que la route de transmission, la stratégie de contournement des barrières physiques et immunitaires des différents hôtes, les effets néfastes sur l'organisme hôte (compromis transmission-virulence) ou encore la défense de l'hôte face à l'invasion. L'article en **annexe 3** aborde une partie de ces questions en évaluant des traits phénotypiques des cellules cancéreuses de MtrBTN2 qui peuvent être impliqués dans la dynamique de transmission et la persistance de ce cancer transmissible. Ces traits sont une survie supérieure des cellules de MtrBTN2 à celle des hémocytes sains dans l'eau de mer, un taux de prolifération de MtrBTN2 important dans les hôtes *M. edulis*, ainsi qu'un effet castrateur qui a été mis en évidence par des analyses histologiques. Pour aller plus loin et évaluer les capacités de défense de l'hôte face à l'invasion de cellules de MtrBTN2, il est nécessaire de s'interroger sur l'existence d'une réponse immunitaire des moules face au MtrBTN2, en l'étudiant au niveau histologique et moléculaire. Cette question s'inscrit dans un contexte où les bases moléculaires de la réponse anti-parasitaire chez les moules sont encore très peu étudiées et l'existence même d'une réponse d'histocompatibilité n'est pas réellement déterminée. Sachant que le cancer transmissible représente un microparasite, eucaryote unicellulaire, et ayant un génome proche de celui de son hôte, les mécanismes d'histocompatibilité apparaissent donc importants à comprendre et à caractériser. Pour commencer à répondre à cela, nous avons réalisé une expérimentation d'allogreffe et de xenogreffe d'hémocytes sains dans des hôtes *M. edulis* et les premières analyses suggèrent que la réponse induite n'est pas très forte car peu de gènes différentiellement exprimés ont été identifiés entre les différents types de greffes et peu de ces gènes différentiellement exprimés appartiennent à des familles de protéines connues pour leur rôle dans l'inflammation et la réponse immunitaire (**annexe 2**).

Dans ce chapitre, seront présentés les résultats issus d'expériences d'infections expérimentales combinées à des analyses de cytologie, d'histologie et de transcriptomique qui ont été menées afin de caractériser une potentielle réponse anticancéreuse chez les moules *M. edulis*. Vingt cinq jours après la greffe de cellules de MtrBTN2, l'état d'envahissement des tissus par les cellules de MtrBTN2 à été étudié en cytologie (envahissement de l'hémolymphe) ainsi qu'en histologie, afin d'étudier les interactions cellulaires au site d'injection et dans les tissus envahis par les cellules de MtrBTN2. Dans un second

temps, ces observations ont été reliées à l'expression des gènes de l'hôte, analysée en transcriptomique par RNAseq. N'ayant pas la visibilité *a priori* de l'évolution de la maladie dans l'hôte et ne sachant pas si la réponse serait localisée ou diffuse, le choix a été fait de réaliser les prélèvements pour les analyses transcriptomiques sur animal entier. De plus, des injections expérimentales de MtrBTN2 antérieures nous ont indiqué une hétérogénéité des stades de développement de la maladie après injection dans des hôtes ayant reçus des cellules cancéreuses de donneuses différentes mais également entre ceux d'une même donneuse. Le paramètre « donneur » a donc été pris en compte et les cellules cancéreuses de 4 donneuses ont été préparées indépendamment et injectées dans plusieurs individus receveurs.

2. Matériel et méthodes

2.1 Obtention du matériel biologique (J-5 à J-1)

Avant de réaliser l'expérimentation de transplant il a été question d'obtenir un nombre suffisant d'individus donneurs nous permettant de tester l'effet « donneur », correspondant à minimum 3 individus affectés par MtrBTN2 à un stade avancé. Pour cela, nous avons réalisé un criblage cytologique de 900 individus issus d'une population d'élevage *M. edulis* située à Agon-Coutainville en Normandie (France, [FIGURE 3.1](#))⁶³. Le criblage des animaux a été réalisé au laboratoire du LABEO à Caen, a démarré dès le prélèvement des animaux sur le terrain le 18/01/2021 et a duré 4 jours. Les individus ont été anesthésiés dans une solution de MgCl₂ (40g MgCl₂, 1/3 d'eau de mer, 2/3 eau distillée, [Suquet et al., 2009](#)), puis l'hémolymphe (40µl) a été prélevée dans le muscle adducteur postérieur à l'aide d'une seringue 1ml munie d'une aiguille de calibre 26 (26G). L'hémolymphe prélevée a ensuite été ajoutée à 140µl de NaCl 2% avant d'être déposé sur lame (SuperFrost™, Thermo Scientific™) par cytospin (Shandon™ Cytospin™ 4, Thermo Scientific™ ; 10 min, 800 rpm), puis fixée et colorée au May-Grünwald Giemsa afin d'être observée au microscope optique. Les individus néoplasiques ayant plus de 90% de cellules cancéreuses dans leur hémolymphe ont été retenus comme individus donneurs (D) afin d'être certains d'injecter une large majorité de cellules de MtrBTN2 aux receveurs. Les individus sains, correspondant aux individus non porteurs de néoplasie, n'ayant ni bactérie ou autres parasites détectable dans l'hémolymphe, ont été gardés comme individus receveurs (R, [FIGURE 3.1](#)).

⁶³ Etant donné la difficulté de maintenir des animaux néoplasiques en laboratoire et la nécessité d'avoir des individus donneurs qui soit à des stades avancées de la maladie, nous avons choisi d'utiliser des individus donneurs directement issus du terrain. Le site choisi correspond au site atelier le mieux connu. La faible prévalence de néoplasies avancées a nécessité le criblage d'un grand nombre d'échantillons.

2.2 Expérimentation de transplant (jour J)

L'expérimentation de transplant par injection a été réalisée sur la station expérimentale Ifremer à Palavas-les-Flots en milieu contrôlé et circuits fermés. Pour réaliser l'acclimatation des individus receveurs, 200 individus dont le statut sain avait été caractérisé durant le premier jour de criblage ont été progressivement transférés dans de l'eau de mer de Palavas durant 4 jours (3:1 puis 1:1 puis 1:3 puis 0:1 eau de mer Agon:Palavas, respectivement). Les individus donneurs, porteurs de MtrBTN2, ont été laissés dans leur eau de mer d'origine tout le long de l'expérience. L'expérimentation de transplant a été réalisée le 23/01/2021 et s'est déroulée en différentes étapes : (i) le prélèvement des individus donneurs et la préparation des cellules de MtrBTN2 et (ii) l'injection dans les individus receveurs ([FIGURE 3.1](#)).

Préparation des inocula de MtrBTN2. Après anesthésie⁶⁴, la totalité de l'hémolymphe de chaque donneur a été prélevée à l'aide d'une seringue² préalablement remplie avec une solution d'Alsever⁶⁵ refroidi à 4°C pour limiter l'agrégation et permettre le comptage des cellules. Les cellules ont ensuite été culotées puis resuspendues dans de l'eau de mer stérile filtrée à 0.2µm. Pour chaque donneur, la quantité de cellules a ensuite été comptée sur lame de Kova puis la concentration a été ajustée pour réaliser des injections de deux doses différentes de MtrBTN2 à différents animaux receveurs : (i) une dose faible de 75 000 cellules pour 100µl et (ii) une dose forte de 750 000 cellules pour 100µl⁶⁶. Les suspensions cellulaires de MtrBTN2 ont été maintenues sur glace jusqu'à l'injection dans les individus receveurs.

Injection des inocula. Pour chaque donneur (D1 à D4) et dose, un minimum de 9 receveurs (NEO) ont été injectés (pour le détail des effectifs voir [TABLEAU 3.1](#) et [FIGURE 3.1](#)). En guise de témoins, certains individus supplémentaires ont reçu une injection d'eau de mer stérile filtrée à 0.2µm (SSW) tandis que d'autres n'ont reçu aucune injection (naïf, NI). Au préalable l'ensemble des individus receveurs (NEO, SSW et NI) avaient été anesthésiés². Puis 100ul d'inoculum a été injecté dans le muscle adducteur postérieur à l'aide d'une pipette 200 munie d'une aiguille 26G insérée à l'extrémité du cône. Pour garantir une homogénéité des inocula de cancer, les cellules ont été resuspendues entre chaque injection (vortex 1 seconde).

⁶⁴ Voir section précédente pour les détails

⁶⁵ Solution d'Alsever composée de glucose, citrate trisodique, EDTA, NaCl et d'eau milliQ. La solution est ensuite filtrée à 0.22µm avant d'être placée à 4°C.

⁶⁶ Il était prévu initialement de réaliser une seule dose (dose faible), mais le prélèvement de deux des donneuses a fourni une quantité de cellules cancéreuses tellement élevée que nous avons choisi de réaliser une condition supplémentaire « dose forte ».

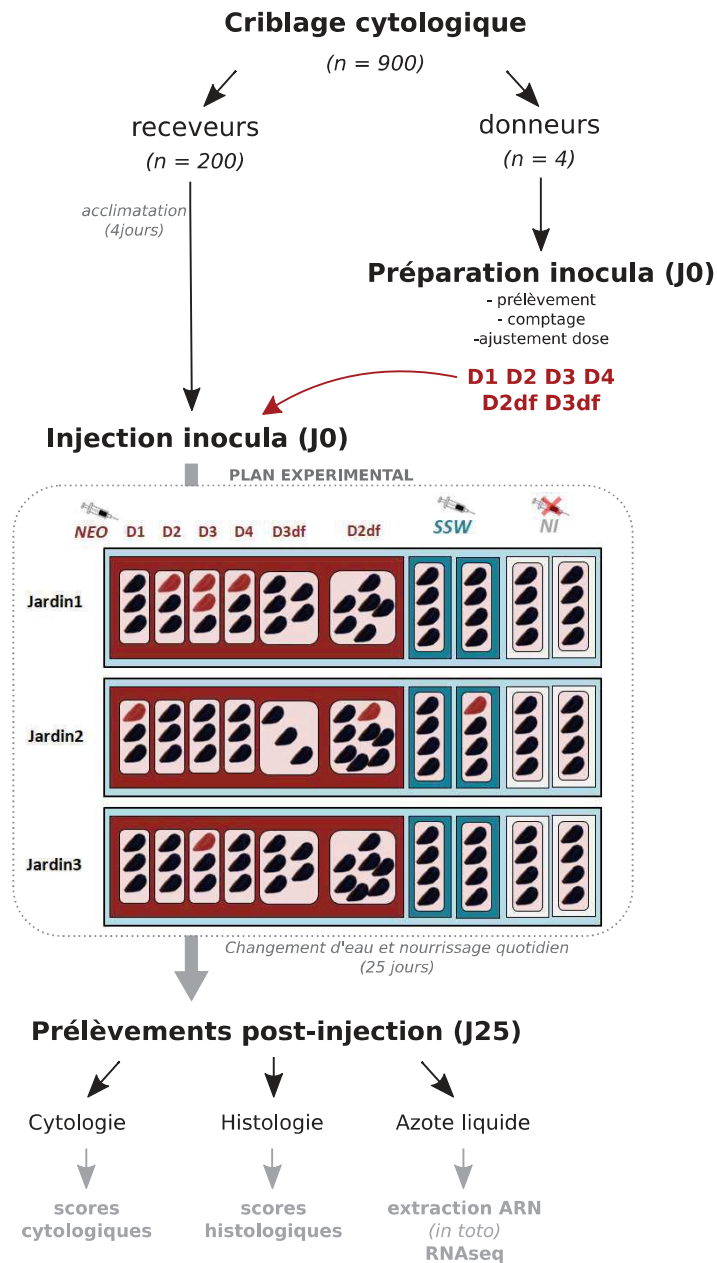


FIGURE 3.1 : Schéma des étapes successives de l'expérimentation décrites dans la section du matériel et méthodes. J0 : jour de l'injection, J25 : 25 jours après injection, NEO : injection de cellules cancéreuses, D1 à D4 : donneuses 1 à 4, df : dose forte, SSW : injection d'eau de mer sterile filtrée à 0.2 µm (témoin), NI : aucune injection (témoin). Les pictogrammes de moule en rouge correspondent aux individus morts entre J0 et J25.

2.3 Maintien des animaux (J0 à J24)

Après injection, les individus receveurs ont été maintenus durant 25 jours dans un circuit fermé d'eau de mer à 13°C préalablement filtrée et constamment traitée aux UVs ([FIGURE S3.1](#)). Les animaux ont été répartis dans trois bacs de 45L (jardins) pour tester la répétabilité de l'expérimentation (voir plan expérimental, [FIGURE 3.1](#)). Quotidiennement, l'eau des bacs était changée et les animaux étaient nourris avec une préparation concentrée de microalgues à hauteur de 0.6ml/ind/jour (recommandations du fournisseur, Shellfish Diet 1800®). Les individus morts au cours des 25 jours ont été retirés des bacs, analysés en histologie lorsque c'était possible, et écartés des analyses transcriptomiques.

2.4 Prélèvement des individus receveurs (J25)

Au 25^{ème} jour après injection, la totalité des individus receveurs ont subi chacun trois types de prélèvements ([FIGURE 3.1](#)): (i) cytologique, (ii) histologique, et (iii) en azote liquide pour les analyses transcriptomiques. Le prélèvement cytologique a été réalisé sans anesthésie⁶⁷ et 20ul d'hémolymphe ont été prélevés, mis sur lame et colorés selon le même procédé décrit précédemment (section 2.1). Une fois détachée de la coquille, une coupe sagittale de la chair a été réalisée. La première moitié de l'individu a été placée dans une cassette d'histologie préalablement identifiée puis fixée pendant 48h dans une solution de Davidson⁶⁸. Les cassettes ont ensuite été transférées dans une solution d'éthanol à 70° avant d'être confiées au plateau technique du RHEM⁶⁹ pour la découpe, le dépôt sur lame et la coloration. La seconde moitié de l'individu a instantanément été congelée dans une coupelle individuelle et maintenue en azote liquide jusqu'au broyage (voir section 2.6).

2.5 Statut pathologique : scores cytologique et histologique

Les lames de cytologie et d'histologie ont été observées en double aveugle à l'aide d'un microscope optique dans le but de déterminer le statut pathologique de chaque individu. L'un des objectifs de l'expérimentation étant de pouvoir analyser les données transcriptomiques au regard des données phénotypiques, des scores cytologiques et histologiques ont donc été déterminés. Pour la cytologie, qui renseigne sur la quantité de cellules cancéreuses présente dans le système circulatoire d'une moule, les scores utilisés ont été tirés de la littérature et sont résumés dans le [TABLEAU 3.2](#). Pour l'histologie, dont l'information principale est l'état d'envahissement des différents tissus et organes (et

⁶⁷ Des expérimentations réalisées précédemment au laboratoire indiquent que l'anesthésie peut avoir un effet sur le transcriptome et varie selon le temps d'anesthésie. Pour éviter un tel biais, les prélèvements cytologiques ont été réalisés en maintenant la coquille ouverte à l'aide d'un cône en plastique.

⁶⁸ Composition du Davidson, une solution composée d'eau de mer stérile filtrée à 0.2µm, d'éthanol 95°, de formaldéhyde 37% et de glycerin en proportion de 3:3:2:1, à laquelle est ajoutée de l'acide acétique à hauteur de 1/10 de part.

⁶⁹ Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier.

TABLEAU 3.1 : Effectifs des individus receveurs des différentes conditions pour l'ensemble des jardins. D1 à D4 donneuses 1 à 4, df : dose forte, SSW : injection d'eau de mer sterile filtrée à 0.2 µm (témoin), NI : aucune injection (témoin), Nb_injecté : nombre d'individus injectés au jour 0, Morta : nombre d'individus morts durant les 25 jours de stabulation, Analysé : le nombre d'individus prélevés au jour 25 et analysés en cytologie, histologie et transcriptomique.

Condition	Jardin	Nb_injecté	Morta	Analysé
NI	J1	8	0	2
	J2	8	0	2
	J3	8	0	2
SSW	J1	8	0	3
	J2	8	1	3
	J3	8	0	2
D1	J1	3	0	3
	J2	3	1	2
	J3	3	0	3
D2	J1	3	1	2
	J2	3	0	3
	J3	3	0	3
D3	J1	3	2	1
	J2	3	0	3
	J3	3	1	2
D4	J1	3	1	2
	J2	3	0	3
	J3	3	0	3
D3df	J1	5	0	5
	J2	3	0	3
	J3	5	0	5
D2df	J1	6	0	6
	J2	8	1	7
	J3	7	0	7

TABLEAU 3.2 : Description des scores cytologiques

score cytologique	Description
0	pas de cellule cancéreuse détectable dans l'hémolymphe
1	<15% de cellules cancéreuses dans l'hémolymphe
2	15-75% de cellules cancéreuses dans l'hémolymphe
3	>75% de cellules cancéreuses dans l'hémolymphe

TABLEAU 3.3 : Description des scores histologiques

score histologique	Description
0	aucune cellule cancéreuse détectable dans les différents tissus
1	cellules cancéreuses uniquement au point d'injection (muscle adducteur postérieur)
2	cellules cancéreuses au point d'injection et autour de la glande digestive
3	cellules cancéreuses au point d'injection et au niveau de plusieurs organes
4	cellules cancéreuses affectant tous les organes
5	remplacement total des tissus par les cellules cancéreuses

non un nombre défini de cellules cancéreuses), les scores ont été définis selon les tissus affectés et sont résumés dans le [TABLEAU 3.3](#).

Les observations histologiques permettent également de déterminer le sexe des individus, leur stade de développement gonadique et leur état physiologique. Pour le sexe, les individus sont mâle (M) ou femelle (F) mais en l'absence de gamètes matures le sexe peut être indéterminé (I). Le développement gonadique a été résumé en cinq stades (*stade_repro*), adaptés de [Lubet \(1959\)](#), comme suit: 0 stade de repos (pas de gamétogénèse), 1 premières étapes de la gamétogénèse, 2 les tubules sont pleins de gamètes, 3 une ponte partielle (les tubules se vident), et 4 la résorption. Comme décrit dans le chapitre d'introduction (section 3.3), le développement gonadique est étroitement lié à l'état des tissus de réserves et donc à la condition physique de l'animal. L'état physiologique a donc été résumé en trois stades : 0 les cellules des tissus de réserves sont épuisées, 1 une partie des cellules de réserves sont remplies et 2 les tissus de réserves sont pleins.

2.6 Broyage et extraction d'ARN

Les individus receveurs congelés ont été broyés individuellement dans l'azote liquide dans des bols en acier inoxydable de 50 ml munis de boules de broyage de 20 mm de diamètre (broyeur Retsch™ MM400) et les poudres obtenues ont été conservées à -80 °C. L'ARN a ensuite été extrait à partir de ces poudres à l'aide du kit Direct-Zol™ RNA Miniprep (Zymo Research Corp.) en suivant le protocole du fabricant. La concentration et la pureté de l'ARN ont ensuite été mesurées à l'aide d'un spectromètre Nanodrop™ One/One© (Thermo Fisher™) avant l'envoi des échantillons pour le séquençage. Ce dernier a été réalisé sur un Illumina Novaseq après que les ADNc ont été générés par transcription inverse à partir des échantillons d'ARN et sélectionnés sur queue polyA. Le séquençage a été réalisé en 2x150pb *paired-end*, avec une profondeur moyenne de 20 millions de *reads* par échantillon.

2.7 Traitement des données RNAseq

La construction des banques et le séquençage⁷⁰ a été réalisé par l'entreprise GENWIZ. Les lectures brutes ont ensuite été nettoyées en retirant les adaptateurs (*TrimGalore* version 0.6.3, [Martin, 2011](#)) et les ARN ribosomaux (*Bowtie2* version 2.3.5, [Langmead & Salzberg, 2012](#)) et en corrigeant les erreurs de séquençage (*Rcorrector* version 1.0.4, [Song & Florea, 2015](#)). La qualité des banques a ensuite été évaluée avec FastQC version 0.11.8 ([Andrews, 2010](#)). Les *reads* nettoyés ont ensuite été alignés sur le

⁷⁰ Bibliothèques ARN *Strand-specific*, sélection des queues *polyA*, séquençage Illumina 2x150bp, 20 millions de *reads* *paired-end*.

génomique de référence *M. galloprovincialis*⁷¹ (Gerdol et al., 2020) à l'aide de l'outil RNAstar version 2.7.8a (Dobin et al., 2013). Le comptage des *reads* a été réalisé avec HTSeq-count version 0.9.1 (Anders, Pyl, & Huber, 2015) et les matrices d'expression générées ont ensuite servi de base pour l'analyse des données.

2.8 Réannotation rapide du génome de référence

Les séquences codantes (CDS) les plus longues de chaque transcript ont été extraites à partir des fichiers fasta et gff3 du génome de *M. galloprovincialis* (GCA_900618805.1, NCBI) à l'aide de l'outil *gffread* (version 0.12.7, Pertea & Pertea, 2020). Les 60 338 CDS générées ont été comparées à la base de données protéiques Uniprot (Uniprot/TrEMBL databank v2021_03) en utilisant l'outil PlastX (Nguyen, 2009). Une recherche de motifs protéiques (Pfam, TMHMM, TIGRFAM, Prosite Profile, SMART, Superfamily, Gene 3D) a également été réalisée sur les mêmes 60 338 CDS en utilisant l'outil InterProScan (Quevillon et al., 2005). Les résultats des interrogations de ces bases de données ont été importés dans OmicsBox (BioBam Spain, 2020) afin de réaliser les étapes d'annotation fonctionnelle permettant de récupérer les annotations et les catégories fonctionnelles (Gene Ontology) de 44 551 CDS (73.8%, [FIGURE S3.2](#)).

2.9 Analyses des données RNAseq

Une première étape d'Analyse en Composante Principale (ACP, fonction *plotPCA()*⁷² du package *DESeq2*, Love, Huber, & Anders, 2014) a été réalisée à partir de la matrice de comptage *log* normalisée (fonction *count()* du package *DESeq2*). Ensuite, une Analyse de Redondance (RDA, fonction *rda()* du package *vegan*, Oksanen et al., 2020) a été utilisée pour évaluer la relation entre la matrice de comptage normalisée et les différentes variables phénotypiques (voir résultats). Les niveaux d'expression différentielle des gènes ont ensuite été analysés à l'aide du package *DESeq2*. Les représentations de données sous forme de *heatmaps* ont été générées avec la fonction *pheatmap()* du package *pheatmap* (Kolde, 2018). L'ensemble de ces analyses a été réalisé avec le logiciel R (R Core Team, 2020).

3. Résultats

3.1 Faible mortalité au cours de l'expérimentation

Durant la période des 25 jours post-injection, une faible mortalité a été observée ([TABLEAU 3.1](#)). Au total, 8 individus sont morts dont 6 avaient reçu une faible dose de cellules cancéreuses, 1 une forte

⁷¹ Seul génome *Mytilus* disponible, le plus proche de *M. edulis*. Alternative à la stratégie d'assemblage *de novo* qui n'a pas pu être réalisée dans le temps imparti.

⁷² Cette fonction a été modifiée de manière à avoir accès aux 10 premiers axes de l'ACP (au lieu de trois dans la fonction initiale).

TABLEAU 3.4 : Synthèse des observations cytologiques et histologiques des individus receveurs.

Neo_mitose : cellules cancéreuses en mitose, Infiltr_Hemo : infiltration hémocytaire, Stade_repro : stade de développement gonadique, Etat_physio : état physiologique, Granulo : granulocytomes, NP : échec du prélèvement d'hémolymphhe.

Information sur l'échantillon				Cytologie	Histologie								
Condition	Jardin	Dose	Nom_ech	Score cytologique	Score Histologique	Neo_mitose	Infiltr_Hemo	Nécrose	Sexe	Stade_repro	Etat_physio	Granulo	
NI	J1	-	NI_J1_1	0	0	-	S	no	M	2	0	+++	
		-	NI_J1_3	0	0	-	no	PI	M	3	0	+	
	J2	-	NI_J2_1	0	0	-	S	no	F	3	0	0	
		-	NI_J2_4	0	0	-	no	no	M	3	0	0	
	J3	-	NI_J3_2	0	0	-	no	no	M	3	0	0	
		-	NI_J3_3	0	0	-	no	no	F	2	0	0	
SSW	J1	-	SSW_J1_1	0	0	-	S	PI	F	3	0	+	
		-	SSW_J1_2	0	0	-	no	PI	F	3	0	0	
		-	SSW_J1_3	0	0	-	no	PI	F	3	0	0	
	J2	-	SSW_J2_2	0	0	-	no	-	M	3	0	+	
		-	SSW_J2_3	0	0	-	no	PI	F	3	0	0	
		-	SSW_J2_4	0	0	-	no	no	M	3	0	0	
	J3	-	SSW_J3_3	0	0	-	no	PI	M	3	1	++	
		-	SSW_J3_4	0	0	-	Mu	PI	F	0	0	0	
		-	SSW_J3_4	0	0	-	Mu	PI	F	0	0	0	
D1	J1	faible	D1_J1_R1	0	0	-	Mu	PI	F	3	0	0	
		faible	D1_J1_R2	1	1	0	Mu	PI	F	3	0	0	
		faible	D1_J1_R3	0	0	-	Mu	PI	F	3	0	0	
	J2	faible	D1_J2_R2	0	1	0	Mu	PI	F	4	0	0	
		faible	D1_J2_R3	0	1	0	Mu	PI	F	4	0	0	
		faible	D1_J3_R1	2	1	+	Mu	PI	F	3	0	0	
	J3	faible	D1_J3_R2	1	2	0	Mu	PI	M	3	0	0	
		faible	D1_J3_R3	0	1	0	Mu	PI	F	4	0	+	
		faible	D1_J3_R3	0	1	0	Mu	PI	F	4	0	+	
D2	J1	faible	D2_J1_R2	2	2	+	Mu	PI	M	4	0	++	
		faible	D2_J1_R3	NP	1	+	Mu	PI	M	2	0	+	
	J2	faible	D2_J2_R1	0	0	-	Mu	PI	F	4	0	0	
		faible	D2_J2_R2	0	2	+	Mu	PI	F	3	0	+	
		faible	D2_J2_R3	0	1	0	Mu	PI	F	4	0	0	
	J3	faible	D2_J3_R1	1	1	0	Mu	PI	F	4	0	+	
		faible	D2_J3_R2	1	2	0	Mu + S	PI	M	3	0	0	
		faible	D2_J3_R3	2	0	0	no	no	M	4	0	0	
	D3	J1	faible	D3_J1_R3	1	1	+	Mu	PI	F	4	0	+++
faible			D3_J2_R1	2	1	+	Mu	no	F	3	0	0	
J2		faible	D3_J2_R2	1	2	0	S	PI	M	4	0	0	
		faible	D3_J2_R3	1	1	0	no	PI	F	4	0	0	
J3		faible	D3_J3_R2	2	2	+	no	no	F	4	0	++	
		faible	D3_J3_R3	1	2	+	Mu + S	PI	M	4	0	0	
D4		J1	faible	D4_J1_R2	1	0	-	no	no	F	4	0	+
			faible	D4_J1_R3	NP	1	+	Mu	no	F	3	0	0
		J2	faible	D4_J2_R1	0	1	0	Mu	no	F	4	0	0
	faible		D4_J2_R2	NP	2	0	no	PI	M	3	0	+	
	faible		D4_J2_R3	1	0	-	no	PI	F	4	0	++	
	J3	faible	D4_J3_R1	2	2	0	Mu	PI	I	0	0	+++	
		faible	D4_J3_R2	1	1	0	Mu	PI	F	4	0	0	
		faible	D4_J3_R3	2	1	0	Mu	PI	M	3	0	0	
	D3df	J1	forte	D3df_J1_R1	2	3	++	Mu + S	PI	M	3	1	+
forte			D3df_J1_R2	2	3	++	Mu	PI	M	3	0	0	
forte			D3df_J1_R3	2	3	++	D	PI	I	0	0	0	
forte			D3df_J1_R4	3	3	++	no	no	I	0	0	+	
forte			D3df_J1_R5	NP	2	+	Mu + D	PI	M	0	0	+	
J2		forte	D3df_J2_R1	2	3	++	S	PI	F	0	0	0	
		forte	D3df_J2_R2	0	1	0	Mu + S	no	M	2	1	0	
		forte	D3df_J2_R3	2	2	0	Mu	PI	F	0	0	0	
		forte	D3df_J3_R1	1	3	++	S	PI	F	4	1	0	
		forte	D3df_J3_R2	2	3	+	Mu + S + D	no	F	4	1	0	
J3		forte	D3df_J3_R3	2	1	0	Mu + D	no	I	0	0	++	
		forte	D3df_J3_R4	2	3	++	no	PI	I	0	1	0	
		forte	D3df_J3_R5	0	0	-	Mu + D	no	F	4	0	+	
		forte	D3df_J3_R5	0	0	-	Mu + D	no	F	4	0	+	
		forte	D3df_J3_R5	0	0	-	Mu + D	no	F	4	0	+	
D2df	J1	forte	D2df_J1_R2	NP	3	+	Mu	no	M	2	0	+	
		forte	D2df_J1_R3	2	2	+	Mu + S	PI	F	3	0	0	
		forte	D2df_J1_R4	3	2	+	Mu	PI	F	3	0	++	
		forte	D2df_J1_R5	2	3	0	Mu + D	PI	M	2	0	0	
		forte	D2df_J1_R6	2	3	+	Mu	no	M	2	0	+	
		forte	D2df_J1_R7	2	3	0	Mu + S	PI	F	3	0	+	
		forte	D2df_J1_R7	2	3	0	Mu + S	PI	F	3	0	+	
	J2	forte	D2df_J2_R3	1	2	0	Mu + D	PI	M	2	0	0	
		forte	D2df_J2_R4	2	2	+	Mu + D	no	M	2	0	+++	
		forte	D2df_J2_R5	0	1	0	Mu	PI	F	4	0	++	
		forte	D2df_J2_R6	3	2	+	Mu	PI	F	4	0	0	
		forte	D2df_J2_R7	3	2	0	Mu	PI	M	3	0	+++	
		forte	D2df_J2_R8	3	3	+	Mu + S	PI	F	3	0	+	
		forte	D2df_J2_R9	3	3	++	Ma + D	PI	M	3	0	+	
	J3	forte	D2df_J3_R2	NP	2	0	Mu + S	PI	F	3	0	0	
		forte	D2df_J3_R3	NP	1	0	Mu + D	PI	F	4	0	++	
		forte	D2df_J3_R4	2	1	+	Mu	no	F	3	0	0	
		forte	D2df_J3_R5	1	3	++	Mu	PI	M	2	0	+	
		forte	D2df_J3_R6	1	0	-	D	no	F	4	1	0	
		forte	D2df_J3_R7	2	2	+	no	no	M	3	0	0	
		forte	D2df_J3_R8	2	3	+	Mu	no	F	3	0	+	

dose de cellules cancéreuses et 1 ayant reçu une injection d'eau de mer. Ces individus ont été écartés de la suite de l'analyse.

3.2 Observations cytologiques et histologiques

3.2.1 *Les moules receveuses développent la maladie à des vitesses différentes*

Pour la quasi-totalité des individus receveurs de néoplasie (NEO), quelle que soit la donneuse ou la dose, des cellules cancéreuses sont observées en cytologie et/ou histologie 25 jours après injection. Sur les 63 receveurs de départ⁷³, 39/63 sont positifs aux deux méthodes, 4/63 positifs uniquement en cytologie, 16/63 positifs uniquement en histologie (dont 7 n'ont pas de diagnostic cytologique⁷⁴) et 4/63 sont négatifs (TABLEAU 3.4). Les individus témoins, n'ayant pas reçu d'injection (NI) ou une injection d'eau de mer filtré stérile (SSW), ne présentent pas de cellules néoplasiques en cytologie ou histologie.

Les observations cytologiques montrent une quantité de cellules cancéreuses variable entre les individus receveurs NEO (FIGURE 3.2, FIGURE 3.3). Cette quantité semble varier selon la dose administrée lors de l'injection, avec une majorité de scores 2 et 3 pour les fortes doses. Les scores ne semblent pas être directement influencés par le type de donneuses, excepté pour la D3 (dose faible) dont le succès de transmission est de 100% (FIGURE 3.2). Les observations histologiques montrent également une hétérogénéité au sein des individus receveurs NEO, avec des scores plus élevés pour les receveuses ayant reçue une forte dose au départ (FIGURE 3.2, TABLEAU 3.4). Indépendamment de la dose, les receveuses de D3 semblent développer plus rapidement la maladie que celles des autres donneuses (FIGURE 3.2). Au-delà de la quantité de cellules néoplasiques, des variations sont observables sur l'état d'envahissement des tissus. En effet, quel que soit l'état d'avancement de la maladie, les cellules cancéreuses sont toujours retrouvées au niveau du point d'injection (muscle adducteur postérieur) entre les fibres musculaires (FIGURE 3.4). A mesure que le nombre de cellules cancéreuses augmente dans le muscle, des cellules sont observées autour de la glande digestive (FIGURE 3.4), puis dans le reste des tissus conjonctifs (FIGURE 3.4). Egalement, les cellules cancéreuses semblent s'accumuler au niveau de l'organe *pligate* (organe excréteur) et leur nombre augmente avec le développement de la maladie (FIGURE 3.4). Enfin, une prolifération de cellules cancéreuses est observable comme le témoignent les nombreuses figures mitotiques observées (FIGURE 3.4, TABLEAU 3.4).

⁷³ Les individus morts au cours de l'expérimentation ne sont pas comptabilisés ici.

⁷⁴ Echec de prélèvement d'hémolymphe (aucune cellule normale ou cancéreuse sur la lame).

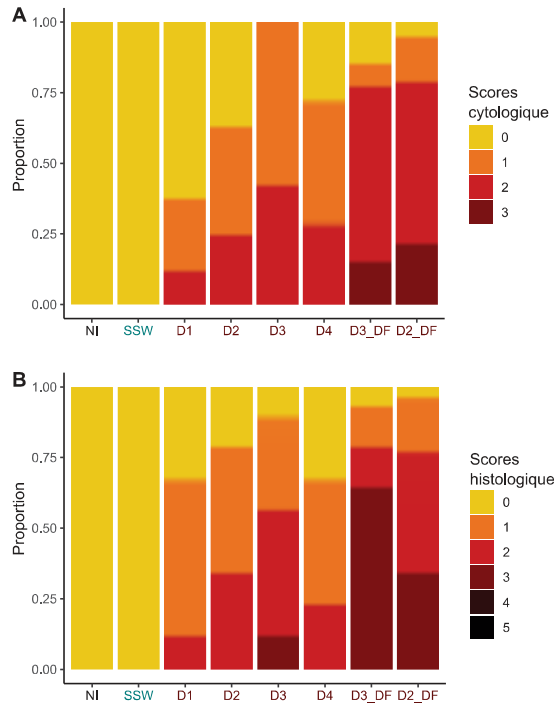


FIGURE 3.2 Scores pathologiques des différentes conditions d'injection. (A) scores cytologique, (B) scores histologique. Témoins naïve (NI), témoins eau de mer (SSW), injection d'une faible dose de cellules cancéreuses (D1 à D4), injection d'une forte dose de cellules cancéreuses (D3_DF et D2_DF).

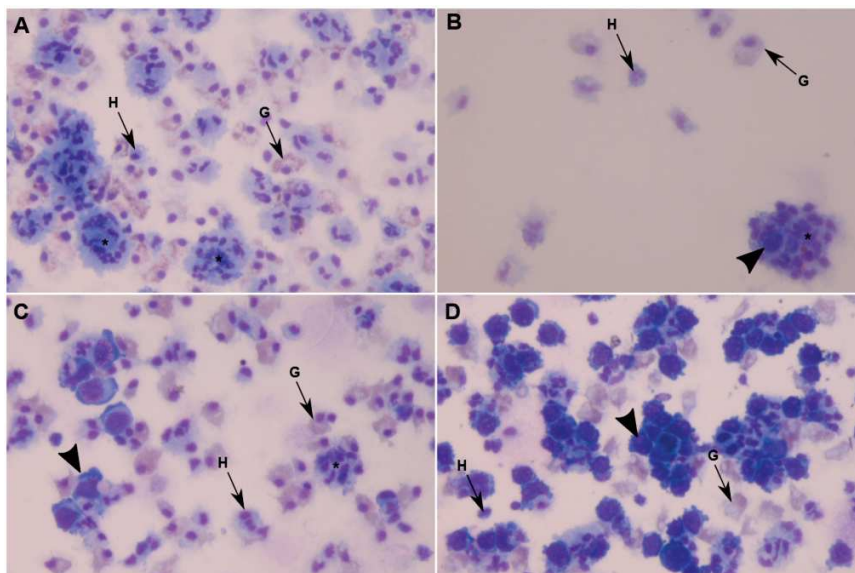


FIGURE 3.3 Observations cytologiques de cellules circulantes dans l'hémolymphe. (A) hémolymphe normale (score 0), (B) néoplasie de score 1, (C) néoplasie de score 2, (D) néoplasie de score 3. Les flèches pointent des hématocytes (H : hyalinocytes, G : granulocytes) et les pointes de flèches indiquent des cellules cancéreuses.

3.2.2 Etat physiologique et réponse tissulaire des receveurs

Les observations histologiques de receveurs NEO montrent la présence d'infiltration hémocytaire dont l'intensité et la localisation varient selon l'individu et le stade d'avancement de la maladie (TABLEAU 3.4). Lorsqu'il y a infiltration, les hémocytes se trouvent majoritairement au niveau du point d'injection (muscle adducteur postérieur), puis autour de la glande digestive et finissent par être observés de manière diffuse à mesure que les cellules cancéreuses envahissent les différents tissus (FIGURE 3.4). Les individus sains présentent également des zones d'infiltration hémocytaire mais elles sont d'une intensité moindre. Dans la majorité des receveuses NEO, une nécrose des tissus musculaires est observée au point d'injection et parfois dans d'autres tissus (FIGURE 3.4). La nécrose au point d'injection est également observée dans les receveuses SSW mais de manière moins prononcée et est quasi-inexistante chez les individus NI. De plus, quelle que soit la condition (NEO, NI, SSW), certains individus présentent des granulocytomes⁷⁵ qui peuvent être en nombre plus ou moins important (TABLEAU 3.4). Dans les individus NEO, les cellules cancéreuses ne sont pas présentes à l'intérieur de ces structures (FIGURE 3.4).

La majorité des individus ont pu être sexés : 29/77 sont des mâles, 43/77 sont des femelles et pour 5/77 le sexe n'a pas pu être déterminé (TABLEAU 3.4, FIGURE 3.4). Les stades de développement gonadique (stade_repro) sont pour la majorité entre 3 et 4, ce qui coïncide avec l'observation d'un épuisement des tissus de réserve (TABLEAU 3.4, FIGURE 3.4). Le sex-ratio est retrouvé proche de l'équilibre pour toutes les conditions de départ sauf D1 pour laquelle un biais vers les femelles est observé (FIGURE S3.3). La répartition des stade_repro au sein des différents scores histologiques n'est pas homogène et les stades 4 sont majoritairement retrouvés dans les scores histologiques élevés (FIGURE S3.3).

3.3 Statut pathologique et profil transcriptomique

Afin de caractériser les observations phénotypiques dans la suite des analyses, nous nous sommes dans un premier temps exclusivement basés sur les scores histologiques. La contrainte de temps n'a cependant pas permis d'ajuster cette caractérisation. De même, l'ensemble des analyses présentées dans le cadre du chapitre sont un premier aperçu des données dont l'analyse sera approfondie par la suite.

3.3.1 Analyses exploratoires

L'analyse en composante principale (ACP), faite à partir de la matrice de comptage normalisée, montre un premier axe expliqué par la variable sexe (8% de variance expliquée, FIGURE 3.5). Sur les axes

⁷⁵ Ils se caractérisent par une accumulation d'hémocytes partiellement structurée avec des cellules aplaties en périphérie et des inclusions éosinophiles au centre.

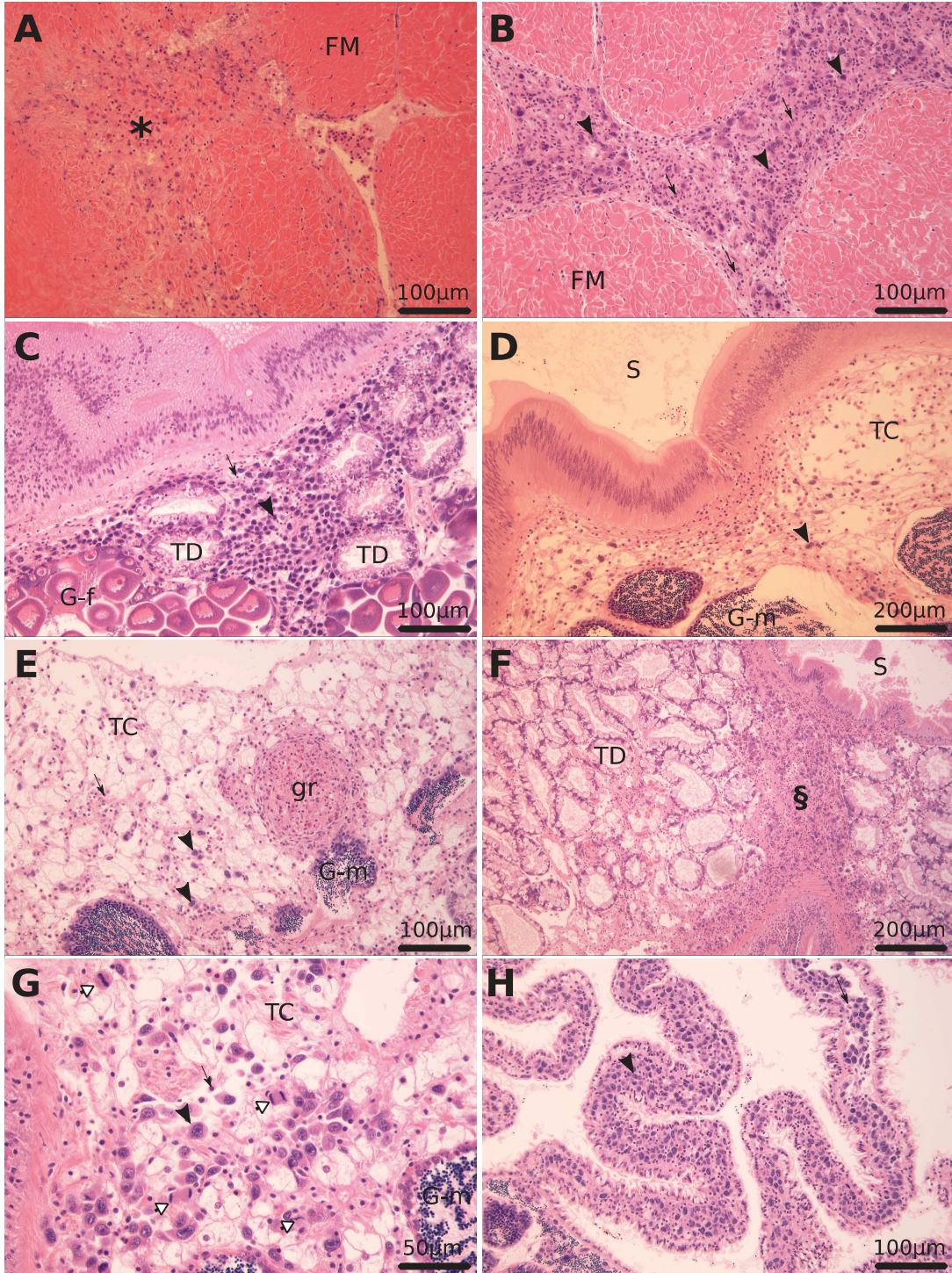


FIGURE 3.4 : Observations histologique des différents dommages tissulaires et des profils d'invasions des tissus par les cellules cancéreuses. (A) Nécrose au niveau des fibres musculaires (*), (B) infiltration hémocytaire (flèche) et cellules cancéreuses (pointe flèche) entre les fibres musculaires, (C) cellules cancéreuses au niveau de la glande digestive sans infiltration hémocytaire notable, présence de gonades femelles, (D) quelques cellules cancéreuses au niveau du tissu conjonctif proche de l'estomac dans lequel se trouve des gonades mâles, (E) aggrégation hémocytaire sous forme de granulocytome, (F) forte infiltration hémocytaire et présence de cellules cancéreuses (§) au niveau du tissu conjonctif proche des tubules digestifs, (G) multiples figures mitotiques de cellules cancéreuses dans le tissu conjonctif (flèches blanches), (H) accumulation de cellules cancéreuses dans l'organe *plicate*. FM : fibre musculaire, TD : tubule digestif, gr : granulocytome, G-f : gonade femelle, G-m : gonade mâle, TC : tissu conjonctif.

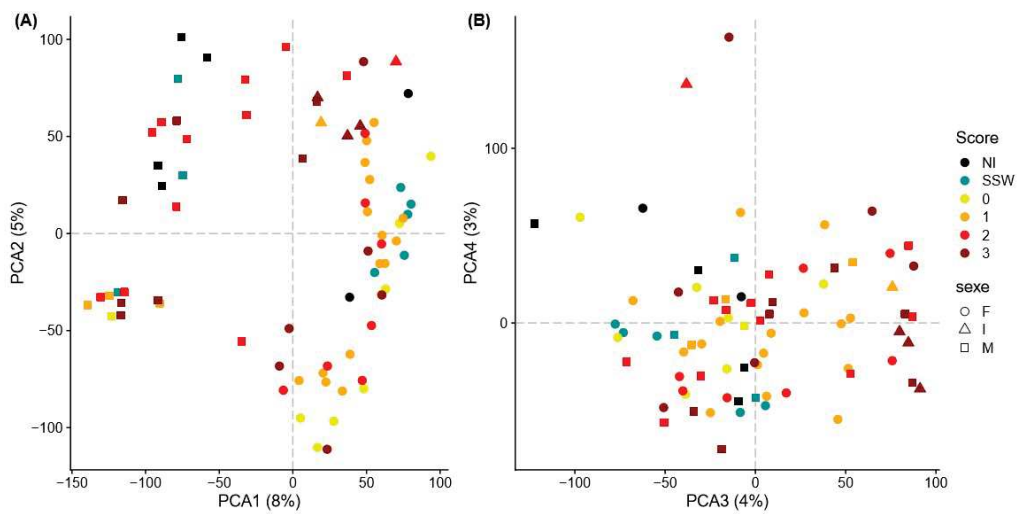


FIGURE 3.5 : Analyse exploratoire mettant en évidence un effet du sexe des individus receveurs sur leurs profils d'expression de gènes. L'axe 1 sépare les individus par sexe, (A) axes 1-2, (B) axes 3-4.

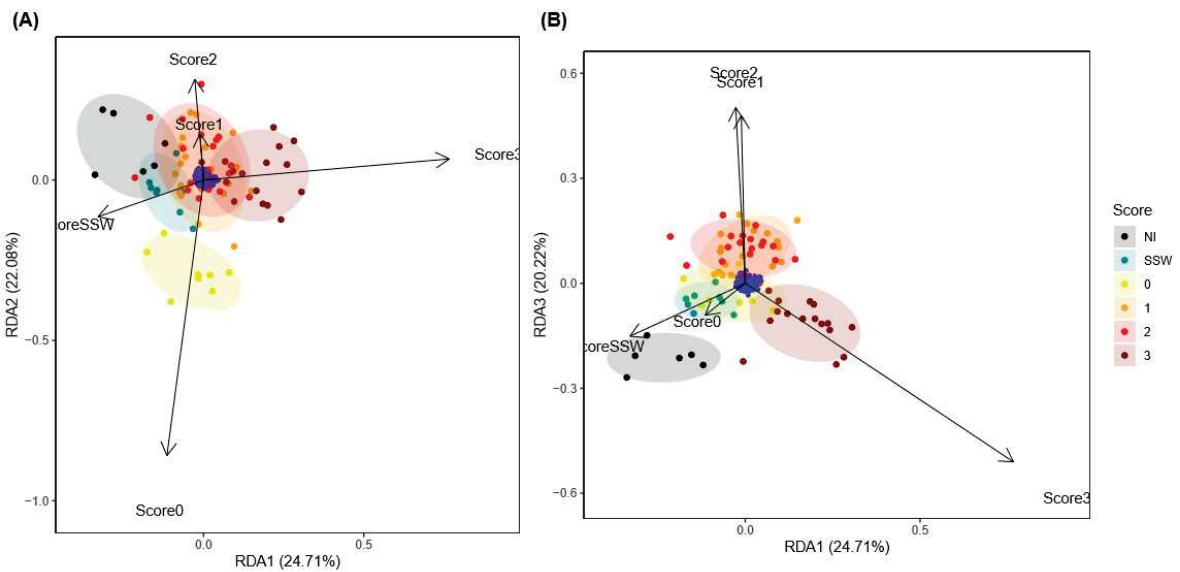


FIGURE 3.6 : Analyse de redondance partielle montrant un regroupement des individus receveurs par groupe pathologique. Réalisée sur la matrice d'expression des gènes normalisée en retirant l'effet sexe, jardin et stade_repro. (A) Axes 1-2, (B) axes 1-3.

suivant, l'effet sexe n'est plus présent mais la distinction entre les scores histologiques est difficile à déceler ([FIGURE S3.4](#)). Pour aller plus loin et tenir compte des effets confondants, une analyse de redondance partielle (RDAP) a été utilisée afin d'expliquer la matrice d'expression par les groupes pathologiques⁷⁶, en retirant la variance induite par les variables sexe, stade_repro et jardin⁷⁷. La part de variance expliquée par la variable score pathologique est de 7%, celle des variables retirées est de 16%, et la part des résidus s'élève à 77%. La représentation graphique des résultats de la RDAP montre une bonne séparation entre les différents groupes pathologiques ([FIGURE 3.6](#), [FIGURE S3.5](#)). En effet, l'axe 1 est tiré par les receveurs NEO de score 3, l'axe 2 par ceux de score 0, l'axe 3 ceux de scores 1 et 2, l'axe 4 distingue les scores 1 des scores 2 et l'axe 5 est tiré par les individus SSW. De plus, les proportions expliquées par chacun des cinq axes sont autour de 20% chacun et semblent indiquer qu'il n'y a pas un groupe qui se différencie plus des autres. Enfin, les variables de groupes apparaissent relativement orthogonales aux axes de la RDAP et, compte-tenu du nombre important de groupes, il est difficile d'extraire une liste de gènes spécifiques de chaque groupe pathologique à ce stade de l'analyse.

3.3.2 Analyses de différentiel d'expression

Pour pouvoir caractériser le profil transcriptomique de chaque groupe pathologique, une analyse différentielle de l'expression des gènes a été réalisée à l'aide de l'outil DESeq2. Dans un premier temps, afin de mettre en évidence les différences majoritaires d'expression des gènes entre les animaux ayant reçu une greffe de MtrBTN2 et les animaux témoins, le jeu de données a été simplifié en deux groupes. D'un côté les non-NEO, composé des NI et des SSW, et de l'autre les receveurs NEO (tous scores confondus). L'analyse de différentiel d'expression entre ces deux groupes montre un total de 712 gènes différentiellement exprimés (DEG, $p_{adj} < 0.05$) dont 649 sont plus fortement exprimés dans les individus NEO et 63 dans les non-NEO ([FIGURE S3.6](#)). La [FIGURE 3.7](#) représente les données d'expression des différents individus pour l'ensemble des DEGs (normalisé par gène) au regard des différentes variables décrites en histologie et en cytologie. Globalement, parmi les gènes dont l'expression varie significativement dans le groupe NEO, on remarque une certaine hétérogénéité avec plusieurs types de profils d'expression qui semblent se dessiner : (i) des gènes fortement exprimés dans les score 3 et faiblement exprimés dans le reste, (ii) des gènes fortement exprimés dans les score 1 et 2 et moins exprimés dans le reste des groupes, (iii) des gènes fortement exprimés dans toutes les NEO et faiblement

⁷⁶ Pour cette analyse nous avons réparti les individus en 7 groupes pathologiques : NI de score histologique 0 (NI), SSW de score histologique 0 (SSW), NEO de score histologique 0 (score0), NEO de score histologique 1 (score1), NEO de score histologique 2 (score2) et NEO de score histologique 3 (score3).

⁷⁷ L'effet jardin n'est pas notable dans les ACP, cependant pour limiter des effets confondants non visibles nous avons choisi d'inclure cette variable.

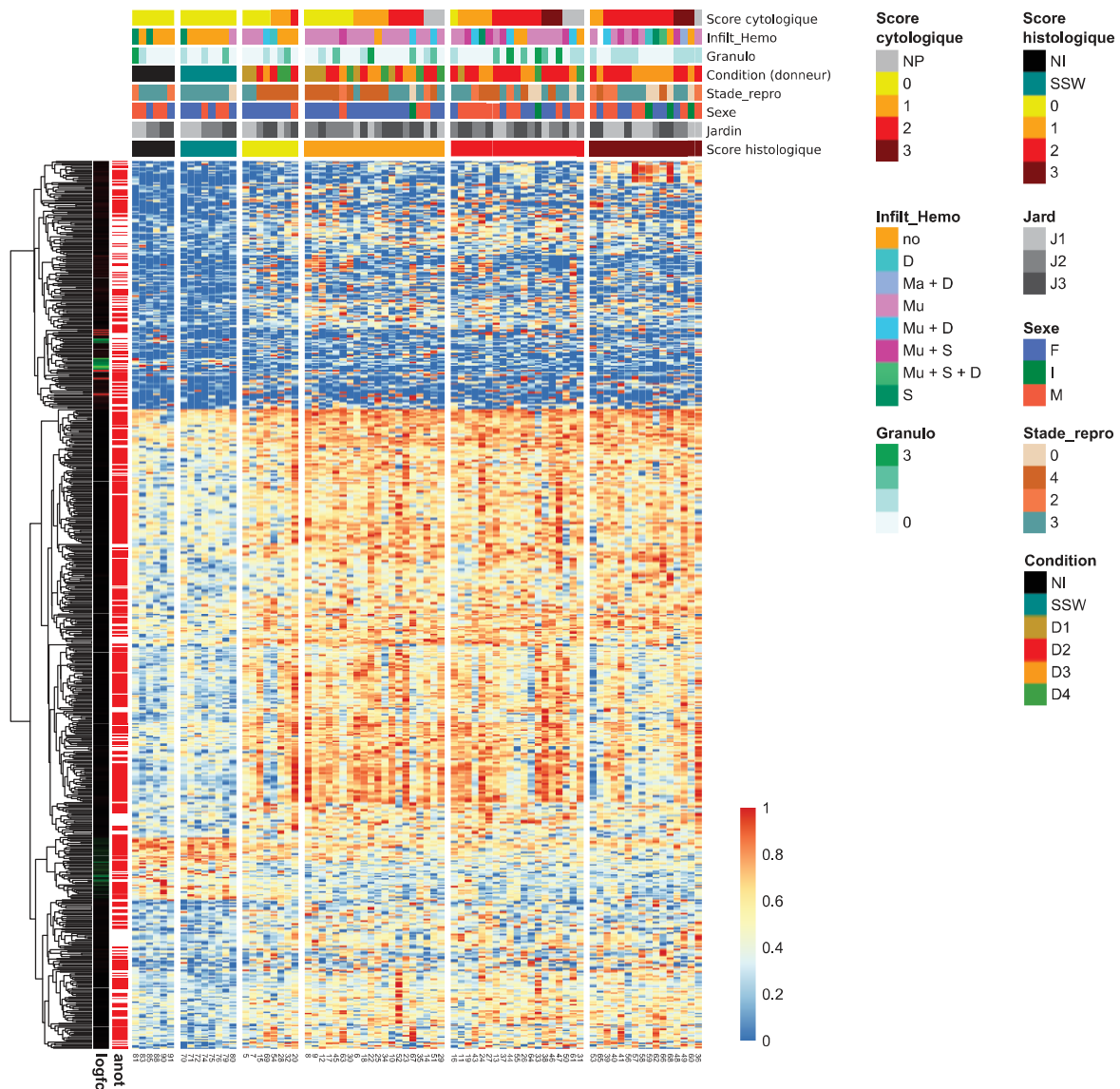


FIGURE 3.7 : Représentation des niveaux d'expression des 712 gènes détectés significatifs par l'analyse différentielle de l'expression des gènes entre les individus témoins et ceux ayant reçu une injection de cellules cancéreuses (non-NEO vs NEO). Les différentes variables du tableau 3.4 sont renseignées en haut du graphique. Pour faciliter la visualisation des profils d'expression par gènes, les valeurs de niveaux d'expression ont été réduites entre 0 et 1 pour chaque gène indépendamment. Logfc : valeur du \log_2 FoldChange calculé dans DESeq2, anot : rouge si le gène est anoté. D : glande digestive, Ma : manteau, Mu : muscle, S : estomac, F : femelle, M : mâle, I : indéterminé.

dans les non-NEO, (iv) et vice-versa, et (v) des gènes fortement exprimés dans certains individus seulement quel que soit le groupe ([FIGURE 3.7](#)).

Sur les 712 DEGs, nous avons réussi à obtenir des annotations fonctionnelles pour 532 d'entre eux⁷⁸ ([TABLEAU S3.1](#)). Une première exploration de ces gènes annotés a permis de mettre en lumière différentes catégories de fonctions fortement exprimées dans les receveuses NEO et a permis de classer 182 des 712 DEGs. Une **première catégorie** regroupe 19 gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire, le stress oxydatif et la mélanisation (Laccase, Cytochrome p450, Peroxidase, Métallothionéine) et des DAMPs potentiels (HMG box). Une **seconde catégorie** complète fonctionnellement la première avec 45 gènes liés à la réponse immunitaire qui sont majoritairement des protéines de types lectines (C1q, TEP et FREP, entre autres) et des PRR membranaires (LRRCT, IgSF, signalisation TOLL, entre autres). Une **troisième catégorie** regroupe 47 gènes impliqués dans la production de la matrice extracellulaire (Collagène, Fibronectine, Tenascine, entre autres) et l'organisation tissulaire, notamment impliqués dans les interactions cellules-cellules (Cadhérines), les interactions cellules-matrice (Intégrines) et dans le remodelage tissulaire (Protéases extracellulaires, FURIN, ADAM12, ADAM17). Une **quatrième catégorie** regroupe 14 gènes potentiellement impliqués dans la différenciation cellulaire (des facteurs de transcription à Homeobox, GATA, MEGF8 et MEGF10, les voies Notch/delta et Wnt/b-Catenine) et le cycle cellulaire (la voie MAPK/Ras, Aurora et Kinase dépendante des Cyclines). Une **cinquième catégorie** correspondant à 51 gènes spécifiques de la physiologie des cellules musculaires et de nombreux éléments du cytosquelette (Calponine, Dystrophin, Titin, Myopalladine Nesprines, Myosines, Microtubules, Formine, SYNE-1, Rac/cdc42). Enfin, dans une **sixième catégorie** se regroupe 6 gènes impliqués dans l'apoptose (Death-domain protein, et CARD-domain proteins). Toutes catégories confondues, la majorité des gènes fortement exprimés dans les receveuses NEO semblent donc impliqués dans une réponse inflammatoire et une réponse immunitaire humorale ainsi que dans la physiologie musculaire et le remodelage tissulaire.

4. Discussion

Dans cette étude nous avons cherché à caractériser la réponse immunitaire des hôtes *M. edulis* suite à l'injection de cellules cancéreuses MtrBTN2. Pour cela, 63 animaux ont reçu une injection d'une forte et d'une faible dose de cellules cancéreuses issues de 4 donneurs indépendamment. Après 25 jours, les individus receveurs ont été prélevés pour un diagnostic cytologique et histologique et les ARNs de

⁷⁸ Il est important de noter que la plupart des annotations fonctionnelles ne sont que partielles (*domain-containing*) et que la vérification de l'ensemble de ces annotations n'a pas pu être rigoureusement réalisée dans le temps imparti.

l'animal entier ont été utilisés pour caractériser l'expression des gènes (RNAseq). Dans un premier temps, les diagnostics cytologiques et histologiques ont permis de montrer que le cancer se développe dans les individus receveurs, et de catégoriser les stades d'avancement en différents scores et groupes pathologiques. Les scores définis semblent varier en fonction de la dose de cellules cancéreuses administrée (les scores pathologiques sont plus élevés pour les doses fortes) et, dans une moindre mesure, de l'individu donneur. Enfin, quelques individus receveurs semblent ne pas avoir développé la maladie ou sont rentrés en rémission totale dans les 25 jours de l'expérience. Dans un second temps, les analyses multivariées (combinant histopathologie et transcriptomique) ont montré que l'expression de certains gènes est expliquée par les différents groupes pathologiques. De plus, l'analyse différentielle de l'expression des gènes en fonction des conditions biologiques (non-NEO vs NEO) dévoile de nombreux DEGs fortement exprimés chez les individus ayant reçu une injection de cellules de MtrBTN2 (NEO), avec certains gènes qui seraient plus fortement induits pour les scores pathologiques 1 et 2 et d'autres plus fortement induits pour le score pathologique 3. L'étude des annotations fonctionnelles de ces DEGs suggère l'induction de phénomènes de réparation tissulaire et de régénération musculaire actifs, associés à une réponse inflammatoire et une réponse immunitaire principalement humorale impliquant de nombreuses lectines. L'observation des coupes histologiques révèle que 25 jours après leur injection dans le muscle adducteur postérieur des moules, les cellules cancéreuses semblent contenues et restreintes au point d'injection où elles se multiplient avant de parfois envahir les tissus du reste de l'organisme. Les analyses des données de transcriptomique restent toutefois préliminaires et devront être affinées pour arriver à caractériser la réponse de l'hôte face aux différents stades d'avancement de la pathologie induite par l'injection de cellules de MtrBTN2.

La réponse inflammatoire et la réparation tissulaire semblent plus fortement induites dans les individus NEO que dans les individus ayant reçu une injection d'eau de mer, ce qui semble en accord avec les observations histologiques. En effet, 25 jours après injection, la cicatrisation de la blessure causée par l'injection elle-même semble bien avancée dans les individus SSW, tandis que pour la plupart des NEO les lésions sont encore visibles et se traduisent majoritairement par une nécrose dans le muscle et une infiltration hémocytaire parfois encore très importante ([FIGURE 3.4](#)). Bien que les lésions soient induites expérimentalement (piqûre lors de l'injection), la présence de cellules cancéreuses au niveau du point d'injection (muscle adducteur postérieur) semble tout de même ralentir la réparation tissulaire. Ces observations histologiques pourraient donc expliquer la réponse inflammatoire et le stress oxydatif, ainsi que la forte activité cellulaire et la mobilisation de protéines de la matrice extracellulaire dans les individus NEO par rapport aux individus NI et SSW. Ce type de fonction est également retrouvé dans le

cadre d'une infection expérimentale de *M. edulis* par des macroparasite *Marteilia intestinalis*, pour laquelle il a été montré que les hôtes régulent l'expression de gènes associés à la cicatrisation des plaies, au cycle et à la division cellulaires, et qu'une sur-expression des gènes impliqués dans la production de ROS est retrouvée dans les hôtes infectés (Feis, John, Lokmer, Luttikhuisen, & Wegner, 2018). Néanmoins, dans le cadre de cette infection, les lésions sont directement induites par l'entrée du parasite au travers des parois de l'intestin, et ne résultent pas d'une infection expérimentale par injection. La production de ROS et de RNS, indicateurs de la réponse inflammatoire, a également été mise en évidence dans la réponse du gastéropode *Biomphalaria glabrata* aux parasites *Schistosoma mansoni* (Coustau et al., 2015) et semble déterminer la compatibilité hôte-parasite (Moné et al., 2011). Cependant, dans le cadre du cancer MtrBTN2 présenté dans de ce chapitre, il est aussi possible que la présence et la prolifération locale du MtrBTN2 au sein du tissu musculaire entretienne des dommages tissulaires de la même manière que la majorité des tumeurs classiques remodelent leur micro-environnement tissulaire et déstabilisent l'intégrité tissulaire via la production notamment de métalloprotéases qui vont dégrader la matrice cellulaire (Kessenbrock, Plaks, & Werb, 2010). L'augmentation de l'expression d'un nombre important de gènes de protéines de matrice extracellulaire (Collagènes, Fibronectines, etc.) pourrait être lié à une réponse du tissu envahie pour compenser les dommages induits par les cellules cancéreuses. Bien que nos analyses soient encore préliminaires à ce stade, ces hypothèses seront à tester dans les travaux complémentaires à venir.

La réponse immunitaire induite semble être majoritairement de type humorale et, bien que les observations histologiques montrent une mobilisation des hémocytes au sein des tissus envahis par le MtrBTN2, il ne semble pas y avoir d'interaction physique directe et visible entre les hémocytes et les cellules cancéreuses. En effet, on n'observe pas d'encapsulation ou d'aggrégation hémocytaire autour des cellules cancéreuses, qui sont des mécanismes de défenses cellulaires souvent observés dans les réponses anti-parasitaires chez les bivalves (Vazquez, Vázquez, & Cremonte, 2017). De plus, parmi les protéines de types lectines induites dans les individus ayant reçu une injection de cellules cancéreuses, se trouvent des FREPs. Ces protéines ont largement été étudiées chez le gastéropode *B. glabrata* où elles occupent un rôle majeur dans l'opsonisation, favorisent l'encapsulation de parasites (Hanington et al., 2010) et permettent d'ajuster la réponse de l'hôte grâce à une grande diversité de variants qui confèrent une reconnaissance spécifique des différents parasites (Moné et al., 2010; Pinaud et al., 2016). Chez les moules *M. galloprovincialis*, 150 FREPs ont été identifiées dans le transcriptome (Gerdol & Venier, 2015), cependant leur rôle fonctionnel et leur implication dans l'immunité ne sont pas bien connus. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour interpréter la réponse majoritairement humorale.

Premièrement, il se peut que les gènes codant pour des protéines impliquées dans la reconnaissance et « l'alerte » ne soient plus fortement exprimés 25 jours après injection et qu'ils soient majoritairement impliqués dans la réponse précoce. Cependant, dans une autre expérience *in vivo* où nous avons injecté des hémocytes sains dans des individus *M. edulis*, la réponse transcriptomique observée ne révèle pas d'activation immunitaire forte dans les premières heures après l'injection des cellules (3h et 24h, voir **annexe 2**) et laisse penser qu'un système d'histocompatibilité basé sur une reconnaissance de PAMPs n'est peut-être pas le mécanisme principal suite à une allogreffe et xenogreffe, mais également face au cancer. Deuxièmement, il est également possible que le signal transcriptomique recherché soit difficilement visible du fait d'avoir travaillé sur l'animal entier et d'avoir induit une blessure qui pourrait générer un bruit important dans les analyses transcriptomiques. Il est également possible que les barrières physiologiques principales soient au niveau de la voie d'entrée naturelle du cancer (qui reste inconnue à ce jour) dans lesquelles les épithélia et le muscus pourraient jouer un rôle important comme cela a été souligné dans le cadre d'infections par des micro-organismes chez les bivalves (pour revue voir [Allam & Pales Espinosa, 2016](#)). Néanmoins, nos résultats indiquent tout de même que les différents individus ne présentent pas tous le même stade d'envahissement des tissus et que la présence du cancer semble avoir un impact sur l'organisme hôte en ralentissant la cicatrisation et en induisant une réponse inflammatoire prolongée. Cela suggère que dans les cas d'envahissements les plus importants, le cancer ait profité de l'injection qui contourne des barrières physiologiques et n'a pas pu être contrôlé par une réponse immunitaire efficace. Un autre paramètre qui n'a pas pu être intégré à cette étude est la cinétique d'envahissement et de réponse. Il est alors difficile d'interpréter les réponses puisque que nous ne connaissons pas la dynamique fine d'envahissement des tissus (en augmentation constante, en augmentation puis régression, etc.). Enfin, nous n'avons pas de mesure de la virulence du MtrBTN2 (ou des MtrBTN2 si les donneurs sont porteurs de sous-lignées différentes) ce qui pourrait également modifier les interprétations. Nos analyses futures devraient nous permettre d'affiner un peu plus notre compréhension des interactions entre le MtrBTN2 et le système immunitaire de l'hôte.

Pour comprendre plus finement ces mécanismes il sera nécessaire d'effectuer des analyses différentielles d'expression en comparant les différents scores pathologiques entre eux. De plus, on observe une hétérogénéité dans les profils d'expression de gènes des individus au sein de chaque score histologique et ces scores pourront être affinés à la lumière des réponses transcriptomiques associées. Pour aller plus loin, il sera également intéressant de déterminer à quelle sous-lignée de MtrBTN2 appartient chaque donneur. D'un point de vue plus méthodologique, le choix de l'utilisation d'un génome de référence dont l'annotation n'est que partielle sera également à réévaluer. La plupart des

études transcriptomiques réalisées chez les moules *Mytilus* sont basées sur des assemblages *de novo*⁷⁹ de transcriptomes dont l'annotation pourrait varier et être potentiellement plus complète. Malgré tout, une fois la liste de gènes d'intérêts stabilisée, il sera nécessaire d'effectuer une vérification rigoureuse des annotations de chacun des gènes et de leur attribution fonctionnelle (GOterm). Selon la quantité de gènes, il sera ensuite intéressant de réaliser des analyses d'enrichissement fonctionnels (de type RBGOA, Rank-Based GO Analysis) et d'analyser la régulation de voies de signalisations (KEGG).

En termes de perspectives, il apparaît que la caractérisation de la voie d'entrée naturelle du cancer MtrBTN2 a une importance fondamentale dans la compréhension des mécanismes de réponse des hôtes ainsi que la permissivité de ceux-ci à l'invasion. Cela permettra d'avoir une vision plus complète de la pression propagulaire et des différents filtres de rencontre déterminant le succès de la transmission du MtrBTN2 entre hôtes. A défaut d'un protocole d'infection expérimentale naturelle, il serait intéressant de réaliser des études combinées d'histopathologie et de transcriptomique sur des individus néoplasiques directement issus du terrain. Enfin, un des résultats de cette thèse montre une prévalence de MtrBTN2 moindre dans *M. galloprovincialis* comparé à *M. edulis* en Europe. L'espèce *M. galloprovincialis* est reconnue comme une espèce plus robuste, notamment face à différents pathogènes et parasites (Coustau et al., 1991; Moreira et al., 2018; Seed, 1969; Tolman et al., 2019), et il serait intéressant de comparer les réponses de ces deux espèces hôtes. Cela, combiné avec une caractérisation transcriptomique des cellules de MtrBTN2 elles-mêmes, permettra de mieux comprendre l'interaction hôte-cancer chez les moules *Mytilus* et contribuera plus généralement à une meilleure compréhension de la biologie et de l'évolution de ces microparasites particuliers.

⁷⁹ Cette option n'a pas été réalisée par manque de temps et du fait des obstacles méthodologiques rencontrés et liés au nombre important d'individus de l'étude.

5. Figures supplémentaires

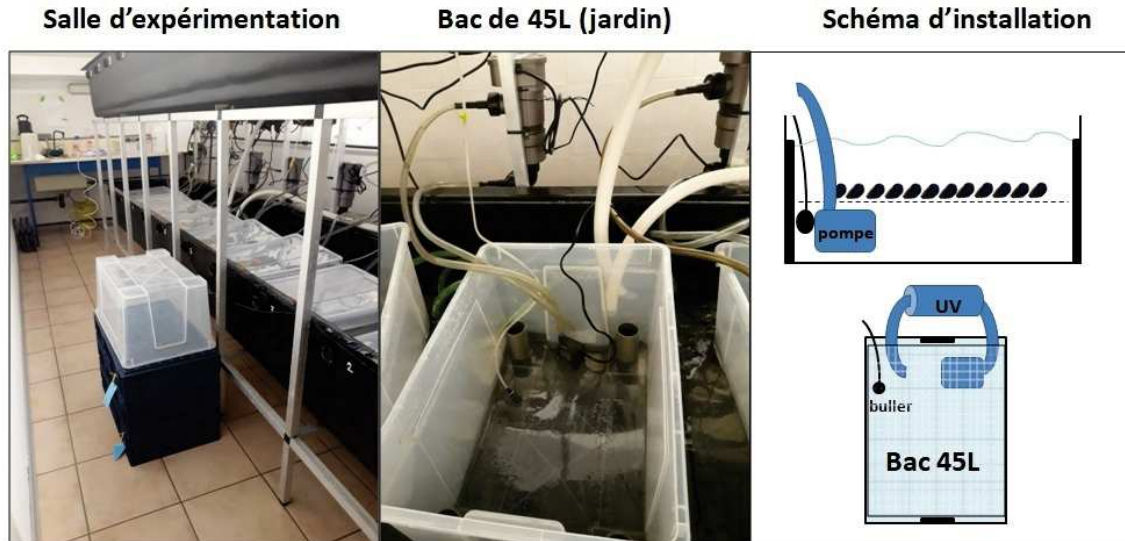


FIGURE S3.1 : Représentation schématique et photographie de l'installation expérimentale.

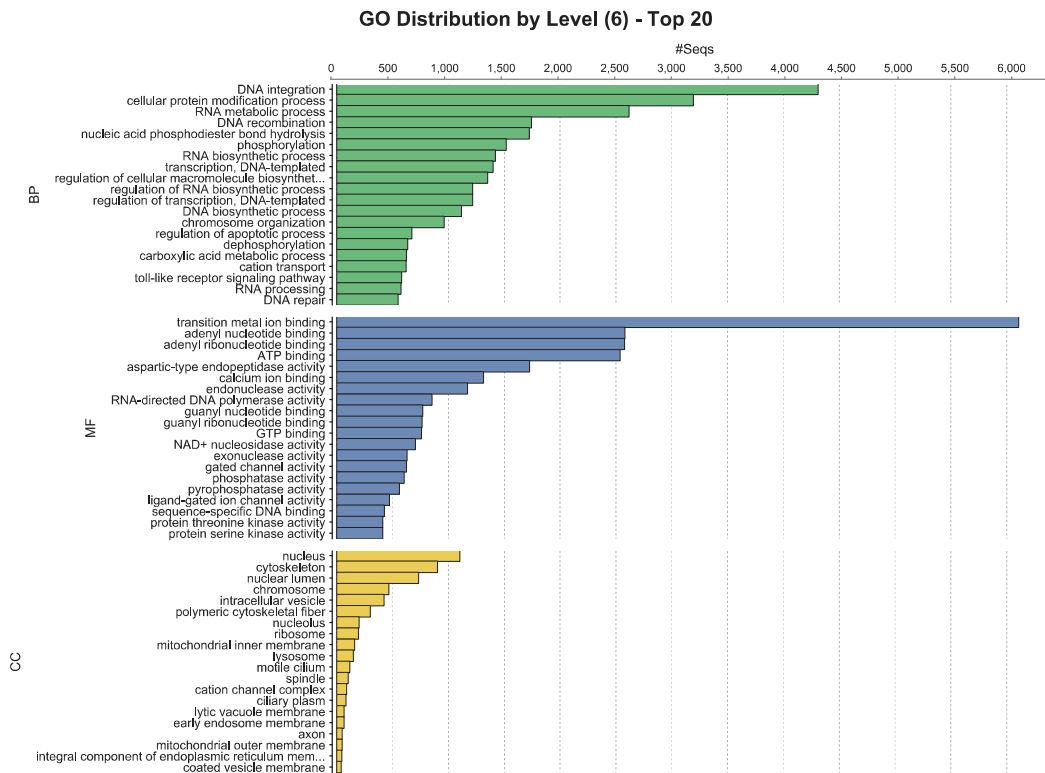


FIGURE S3.2 Catégories Gene Ontology majoritairement représentées dans l'annotation (Blast2Go)

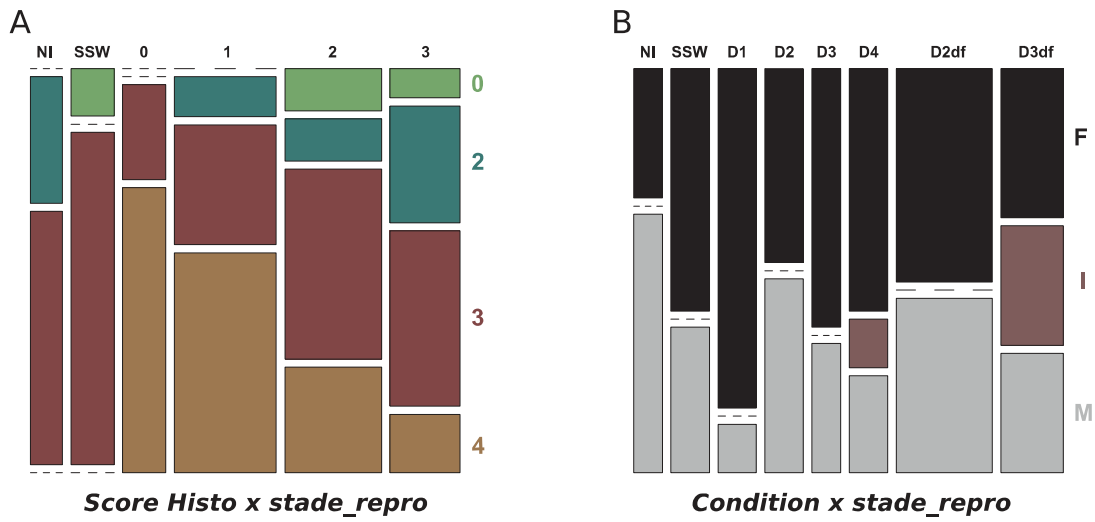


FIGURE S3.3 : (A) Représentation des différents stades de développements gonadiques en fonction du groupe pathologique. (B) Représentation des différents sexes en fonction de la condition d’injection de départ. NI: naïve, SSW: injection d’eau de mer, les différents scores histologiques de 0 à 3.

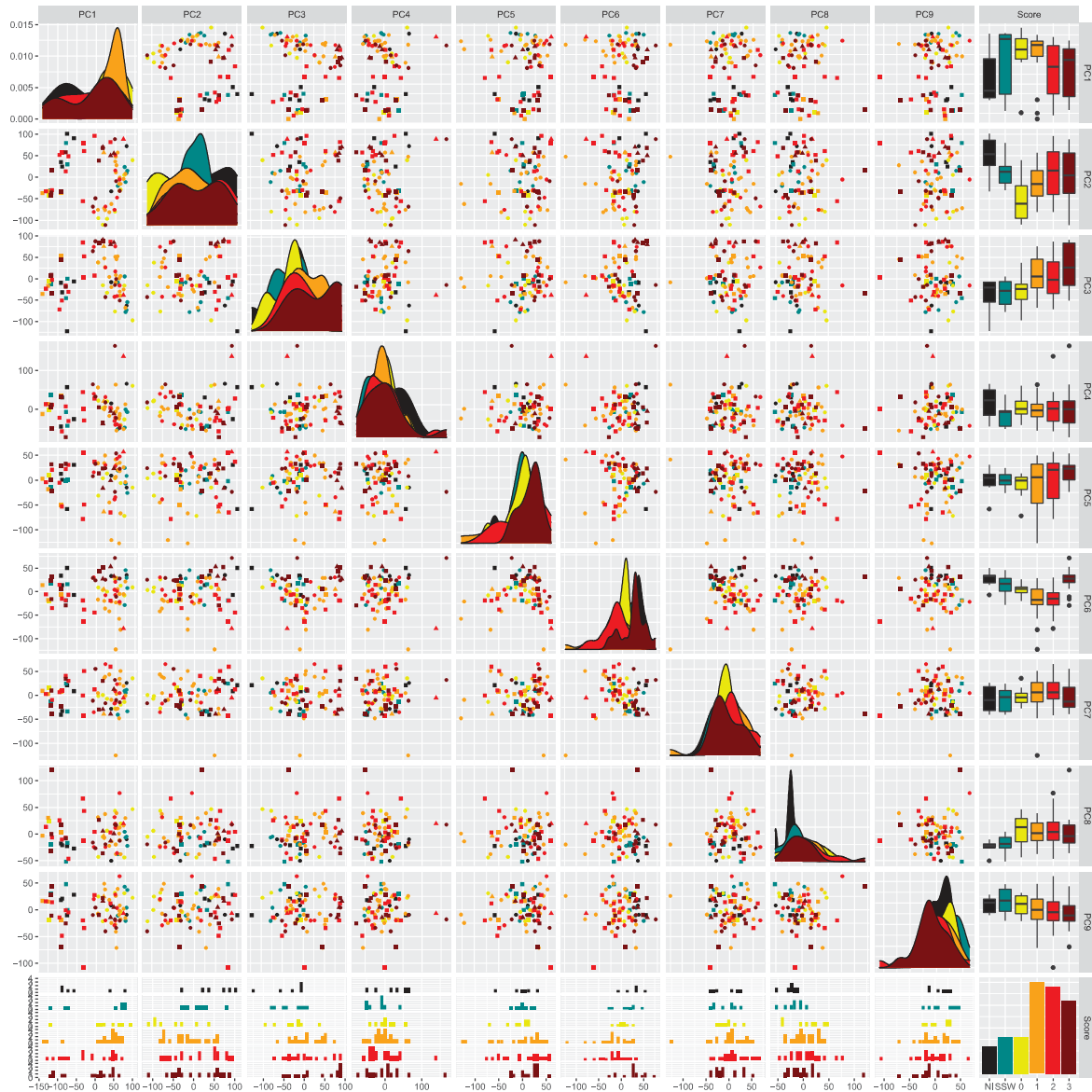


FIGURE S3.4 Représentation graphique des 10 premiers axes de l'Analyse en Composante Principale réalisée sur la matrice d'expression des gènes normalisée (DESeq2). NI : noir, SSW : bleu, Score 0 : jaune, Score 1 : orange, Score 2 : rouge, Score 3 : rouge foncé.



FIGURE S3.5 Représentation graphique des 5 axes de l'analyse de redondance partielle réalisée sur la matrice d'expression des gènes normalisée (DESeq2). NI : noir, SSW : bleu, Score 0 : jaune, Score 1 : orange, Score 2 : rouge, Score 3 : rouge foncé. Les doses faibles sont représentées par les triangles et les doses fortes par les carrés.

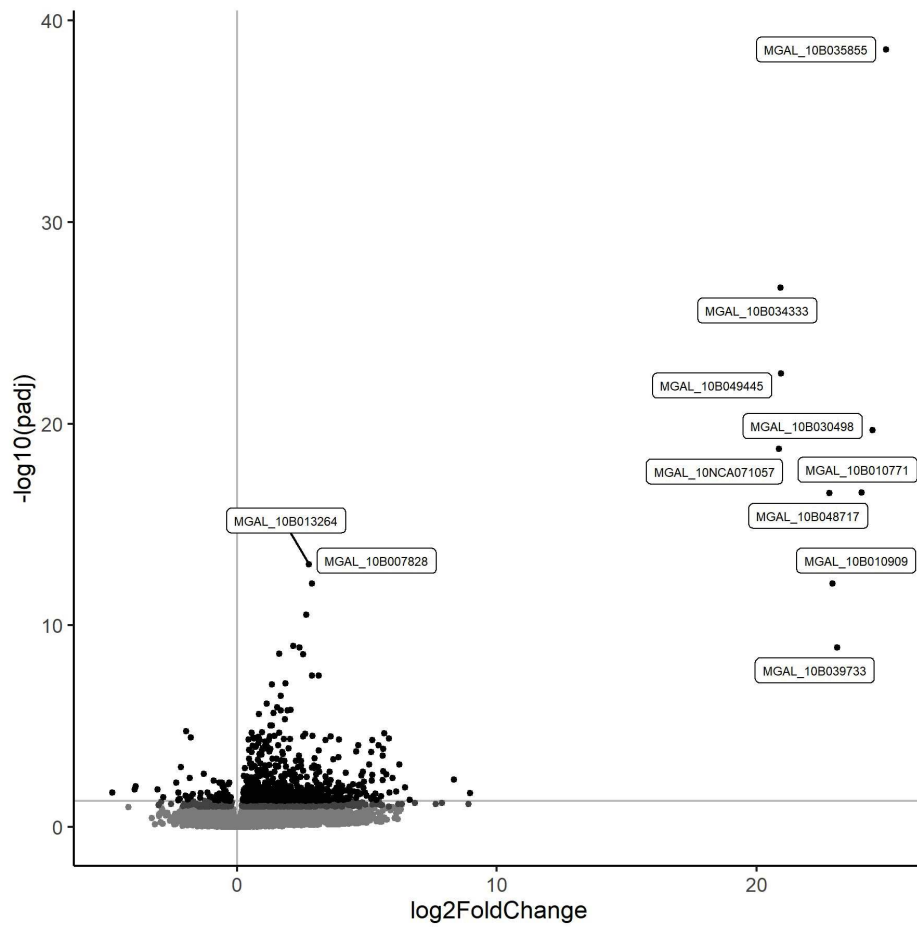


FIGURE S3.6 Volcano plot des gènes différentiellement exprimés entre les NEO et les non-NEO (NI et SSW).

TABLEAU S3.1 : Annotation et classification fonctionnelle des 182/712 gènes différentiellement exprimés entre les individus témoins (NI, SSW) et ceux ayant reçu une injection de cellules cancéreuse (scores 0, 1, 2, 3).

geneID	log2FoldChange	padj	Description de la séquence	Fonction	Catégorie
MGAL_10B068815	8,968404742	0,020829	Metallothionein	Redox	Redox/Inflammation
MGAL_10B052111	5,853362276	4,17E-05	Foot protein-6	Redox-Reducteur / Adhesion	Redox/Inflammation
MGAL_10B063100	5,35466403	0,044010	PXDN	Redox / Peroxidasin	Redox/Inflammation
MGAL_10B060023	3,733697574	0,016060	Cytochrome P450 2U1	Redox / Stress / Detox	Redox/Inflammation
MGAL_10B012958	3,44430952	0,045337	Peroxidase	Redox	Redox/Inflammation
MGAL_10B080058	2,970184799	3,86E-04	Cytochrome P450 10	Redox / Stress / Detox	Redox/Inflammation
MGAL_10B046732	2,879835487	0,001150	Cytochrome P450 10	Redox / Stress / Detox	Redox/Inflammation
MGAL_10B004517	2,614682528	0,035453	EGF-like domain-containing protein	PXDN / Peroxidasin / Redox	Redox/Inflammation
MGAL_10B089317	1,420907415	0,047416	Laccase-6	Redox	Redox/Inflammation
MGAL_10B048881	1,368373171	0,040383	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	Redox	Redox/Inflammation
MGAL_10B052266	1,067369698	8,83E-05	LRP1	LDL Receptor/Inflammation	Redox/Inflammation
MGAL_10B017144	0,866388908	2,42E-04	LRP1	LDL Receptor/Inflammation	Redox/Inflammation
MGAL_10B030776	0,792729502	0,006309	HMG box domain-containing protein	DAMP/Inflammation	Redox/Inflammation
MGAL_10B032705	0,765893961	0,006328	Cubilin	HDL receptor / Metabolism lipoprotein	Redox/Inflammation
MGAL_10B063281	0,666316504	9,51E-04	Apolipoprotein E receptor	Physio Lipoprotein / Cholesterol	Redox/Inflammation
MGAL_10B054542	0,616336573	3,72E-05	EGF-like domain-containing protein	LDL receptor / Lipide metabolism	Redox/Inflammation
MGAL_10B003225	0,558987904	1,88E-04	HMG box domain-containing protein	DAMP/Inflammation	Redox/Inflammation
MGAL_10B010233	0,450714601	1,51E-04	Low-density lipoprotein receptor-related protein	LDL Receptor	Redox/Inflammation
MGAL_10B065388	-0,436892721	0,032675	NADH-cytochrome b5 reductase	Redox	Redox/Inflammation
MGAL_10B049445	20,95381938	3,31E-23	RING-type domain-containing protein	RNF213 E2 ubiquitin ligase	physioC
MGAL_10B054026	5,863208157	0,019303	FLYWCH-type domain-containing protein	Facteur de transcription / Zinc Finger	physioC
MGAL_10B085840	5,656983291	2,21E-05	G_PROTEIN_RECEP_F1_2 domain-containing protein	RCPG	physioC
MGAL_10B018841	4,189420017	0,002006	EGF-like domain-containing protein	Adhesion cell/cell cell/ECM « lactadherin »	physioC
MGAL_10B005622	3,704378531	4,38E-04	RNF213	E3 ligase / Dynein like / Ubiquitin	physioC
MGAL_10B054872	3,001218677	0,004722	G_PROTEIN_RECEP_F1_2 domain-containing protein	RCPG	physioC
MGAL_10B049802	2,61253817	0,027952	G_PROTEIN_RECEP_F1_2 domain-containing protein	RCPG	physioC
MGAL_10B029987	1,526039772	0,016464	G_PROTEIN_RECEP_F1_2 domain-containing protein	RCPG	physioC
MGAL_10B011125	1,334762601	8,36E-08	SYNE1	Cytoskeleton /SYNE-1 / Intracell	physioC
MGAL_10B092269	1,077596849	5,86E-05	SYNE1	Cytoskeleton /SYNE-1 / Intracell	physioC
MGAL_10B061431	0,786263815	0,027485	G_PROTEIN_RECEP_F1_2 domain-containing protein	RCPG	physioC
MGAL_10B047139	0,74113435	0,047416	G_PROTEIN_RECEP_F1_2 domain-containing protein	RCPG	physioC
MGAL_10B092181	0,731767104	0,041938	G_PROTEIN_RECEP_F1_2 domain-containing protein	RCPG	physioC
MGAL_10B043743	0,70555232	0,012560	Kinesin motor domain-containing protein	Microtubules / trafic vesiculaire	physioC
MGAL_10B000976	0,691555004	0,011729	Nesprin-1	Cytoskeleton /SYNE-1 / Intracell	physioC
MGAL_10B090070	0,670259083	0,021765	Kinesin motor domain-containing protein	Microtubules / trafic vesiculaire	physioC
MGAL_10B018928	0,574920997	0,018314	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 5	Cytoskeleton / cell shape	physioC
MGAL_10B085810	0,565409069	0,034630	G_PROTEIN_RECEP_F3_4 domain-containing protein	RCPG	physioC
MGAL_10B018275	0,525206404	0,003866	Dynein heavy chain 5, axonemal	Moteur des microtubules	physioC
MGAL_10B048457	0,503376665	7,12E-04	DOCK1	Facteur d'échange Rac / Cdc42	physioC
MGAL_10B084767	0,500905994	0,041115	KIF1	Microtubules	physioC
MGAL_10B004839	0,495820427	0,012103	ASAP	MAP9 / Microtubules / Division cellulaire	physioC
MGAL_10B084131	0,489809507	0,042188	Nesprin-1	Cytoskeleton /SYNE-1 / Intracell	physioC
MGAL_10B060470	0,425981354	0,005626	ARHGAP12_27	RhoGAP	physioC
MGAL_10B088968	0,420008444	0,015390	Nesprin-1	Cytoskeleton /SYNE-1 / Intracell	physioC
MGAL_10B088021	0,417020061	0,032969	ARHGAP32	RhoGAP	physioC
MGAL_10B059008	0,407189648	0,024101	Intersectin-1	Trafic vesiculaire	physioC
MGAL_10B071058	0,36005091	0,034160	IQGAP1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	physioC
MGAL_10B077489	0,345270466	0,026339	Rab11 family-interacting protein 3	Trafic vesiculaire	physioC
MGAL_10B048905	0,32273792	0,020087	ARHGAP5	RhoGAP	physioC
MGAL_10B062004	0,292589813	0,040061	DOCK9_10_11	Facteur d'échange Rac / Cdc46	physioC
MGAL_10B064569	0,284124111	0,023869	E3 ubiquitin-protein ligase CBL	Metabolism des protéines / proteasome	physioC

MGAL_10B060913	0,247997918	0,048159	Kinesin-like protein	Microtubules / trafic vesiculaire	physioC
MGAL_10B041534	0,222748005	0,043114	E3 ubiquitin-protein ligase	Metabolism des protéines / proteasome	physioC
MGAL_10B030518	-0,559055007	0,009485	RAP domain-containing protein	GTPase / Cell adhesion / Integrin	physioC
MGAL_10B052395	-0,697895017	0,006309	Delta-tubulin	Microtubules	physioC
MGAL_10B049139	3,872803008	0,035724	MEGF10_11	Regeneration musculaire !!	Muscle
MGAL_10B065432	2,707196719	0,011870	CHRNA10	Acétylcholine receptor / Neuro-Muscular	Muscle
MGAL_10B028665	2,402441585	1,25E-09	Titin	Cytoskeleton / Muscle	Muscle
MGAL_10B059352	2,159046246	1,06E-09	Titin	Cytoskeleton / Muscle	Muscle
MGAL_10B085270	1,883614193	0,025505	TTN	Cytoskeleton / Muscle	Muscle
MGAL_10B075165	1,697195499	0,035390	Calmodulin	Calcium cellulaire / Muscle ?	Muscle
MGAL_10B046470	1,677912019	1,67E-06	Myopalladin	Cytoskeleton / Muscle	Muscle
MGAL_10B072667	1,112140077	0,002242	CDC42	Rho GTPase / Cytoskeleton / Actin	Muscle
MGAL_10B018185	0,953024828	1,95E-05	Dystrophin	Proteine musculaire	Muscle
MGAL_10B027916	0,669351375	0,040274	Protein unc-45 homolog B	Myosin Chaperon / muscle	Muscle
MGAL_10B032122	0,664990548	0,011025	CDC42	Rho GTPase / Cytoskeleton / Actin	Muscle
MGAL_10B076749	0,54820233	0,001136	MEGF8	Développement / BMP pathway	Muscle
MGAL_10B083302	0,507120734	0,021072	Myosin-I heavy chain,Unconventional myosin-IXb,Myosin-2 heavy chain,Unconventional myosin-VIIa	Cytoskeleton / contractility / Muscle	Muscle
MGAL_10B054173	0,461445971	0,006526	Myosin-I heavy chain,Unconventional myosin-IXb,Myosin-2 heavy chain,Unconventional myosin-VIIa	Cytoskeleton / contractility / Muscle	Muscle
MGAL_10B045185	0,352286754	0,014269	FNBP1	Formin / Cytosquelette / Actin	Muscle
MGAL_10B010909	22,94322387	8,24E-13	AIG1-type G domain-containing protein	IMAP GTPase	Immunity
MGAL_10B058542	6,474581855	0,011085	C1q domain-containing protein	C1p / Lectin Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B060039	5,59715832	0,004557	Ig-like domain-containing protein	IgSF PRR / Histocomp ?	Immunity
MGAL_10B033772	5,535810883	0,029961	IRG-type G domain-containing protein	Interferon response GTPase	Immunity
MGAL_10B039082	5,322204761	0,021804	C1q domain-containing protein	C1p / Lectin Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B003385	4,92063738	0,018958	Fibrinogen C-terminal domain-containing protein	Ficolin/Lectin/Coagulation / Inflammation / FREP ?	Immunity
MGAL_10B053823	4,846208243	0,001833	IRG-type G domain-containing protein	Interferon response GTPase	Immunity
MGAL_10B062350	4,646071838	0,018822	C-type lectin domain-containing protein	Lectine / PRR / Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B070300	4,505965604	0,017185	LRRNT domain-containing protein	LRR / PRR ? Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B021530	4,176117497	0,040483	C-type lectin domain-containing protein	Lectine / PRR / Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B077692	4,037701457	0,015925	Fibrinogen C-terminal domain-containing protein	Ficolin/Lectin/Coagulation / Inflammation / FREP ?	Immunity
MGAL_10B048784	3,956442329	0,040576	C1q domain-containing protein	C1p / Lectin Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B007980	3,905403548	0,043959	C1q domain-containing protein	C1p / Lectin Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B062603	3,573852708	0,018148	DMBT1	Agglutinin/lectin/Innate/Immunity	Immunity
MGAL_10B069285	3,556691261	0,036368	C1q domain-containing protein	C1p / Lectin Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B035721	3,367338879	0,034630	Fibrinogen C-terminal domain-containing protein	Ficolin/Lectin/Coagulation / Inflammation / FREP ?	Immunity
MGAL_10B013148	3,154485035	0,001812	C1q domain-containing protein	C1q / Lectin Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B041119	3,062394567	0,049828	C1q domain-containing protein	C1p / Lectin Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B083352	2,627722026	0,045337	TRIM2_3	TLR signaling ? Immunité	Immunity
MGAL_10B088452	2,597018311	0,020087	C1q domain-containing protein	C1p / Lectin Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B057588	2,577721704	0,048867	Fibrinogen C-terminal domain-containing protein	Ficolin/Lectin/Coagulation / Inflammation / FREP ?	Immunity
MGAL_10B039292	2,531644636	0,034411	C1q domain-containing protein	C1p / Lectin Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B061809	2,311958865	0,015227	C-type lectin domain-containing protein	Lectine / PRR / Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B051746	2,224096494	0,048951	Mytilin A5	Antimicrobial Peptide	Immunity
MGAL_10B077345	2,166507915	0,001403	C1q domain-containing protein	C1q/ Lectin Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B089247	1,990604437	0,023982	Fibrinogen C-terminal domain-containing protein	Ficolin/Lectin/Coagulation / Inflammation / FREP ?	Immunity
MGAL_10B072756	1,983097327	0,033865	C1q domain-containing protein	C1p / Lectin Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B010559	1,982301883	0,042290	CD109	TEP / Immuno anti-parasitaire	Immunity
MGAL_10B023713	1,892785548	0,017224	C-type lectin domain-containing protein	Lectine / PRR / Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B007877	1,878294826	0,044775	TIR domain-containing protein	TLR signaling ? Immunité	Immunity
MGAL_10B094622	1,836168597	0,028658	Mytilin C	Antimicrobial Peptide	Immunity
MGAL_10B037851	1,826886214	0,049768	C1q domain-containing protein	C1p / Lectin Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B076741	1,764217657	2,47E-04	LRRNT domain-containing protein	LRR / PRR ? Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B082093	1,754922716	0,023116	C-type lectin domain-containing protein	Lectine / PRR / Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B083341	1,293427251	0,039983	C-type lectin domain-containing protein	Lectine / PRR / Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B086057	1,212710266	0,007504	C1q domain-containing protein	C1p / Lectin Innate Immunity	Immunity

MGAL_10B018907	1,209748299	0,027325	Ig-like domain-containing protein	IgSF PRR / Histocomp ?	Immunity
MGAL_10B088239	1,073549865	0,039983	C-type lectin domain-containing protein	Lectine / PRR / Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B059461	0,931143091	2,61E-04	C-type lectin domain-containing protein	Lectine / PRR / Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B046729	0,813595183	0,043959	C-type lectin domain-containing protein	Lectine / PRR / Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B041622	0,716097523	0,010975	LRRCT domain-containing protein	LRR / PRR ? Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B057134	0,683174705	0,035992	C-type lectin domain-containing protein	Lectine / PRR / Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B073522	0,641829556	0,037119	CLEC3B	C-type Lectin / Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B022346	0,446852901	0,019920	Ig-like and fibronectin type-III domain-containing protein C25G4,10	IgSF PRR / Histocomp ?	Immunity
MGAL_10B003826	0,325995483	0,017921	LRRC16	LRR / PRR ? Innate Immunity	Immunity
MGAL_10B035855	25,0036227	2,83E-39	VWFD domain-containing protein	Extracellular protein	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B010771	24,04800723	2,63E-17	Fibronectin type-III domain-containing protein EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1,Fibrillin-1,Fibulin-2,Mucin-like protein,Fibrillin-2,Matrilin-3	Extracell Prot / Protocadherine ? /matrix	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B041988	5,989745074	0,003667		Mucine	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B041548	4,872660528	0,005628	Fibronectin type-III domain-containing protein	Extracell Prot / matrix	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B012305	3,137107131	3,08E-08	Tenascin-X	Extracell Prot / matrix	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B010074	2,883066201	3,16E-08	Tenascin-X	Extracell Prot / matrix	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B007828	2,871492286	8,24E-13	Tenascin-X	Extracell Prot / matrix	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B019950	2,788194315	0,028484	Short-chain collagen C4	Collagen ECM	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B013264	2,759625715	9,38E-14	Tenascin-X	Extracell Prot / matrix	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B024551	2,667184084	2,89E-11	Tenascin-X	Extracell Prot / matrix	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B081294	2,613068302	2,37E-05	Tenascin-X	Extracell Prot / matrix	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B075772	2,535014658	2,78E-09	Tenascin-X	Extracell Prot / matrix	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B008704	2,121883095	0,018572	COL6A	ECM Collagen	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B069308	2,016421218	0,042188	VWFA domain-containing protein	Extracellular protein	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B014604	1,928860005	1,67E-06	VWFA domain-containing protein	Extracellular protein	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B039830	1,871978007	0,001008	VWFA domain-containing protein	Extracellular protein	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B024501	1,834509085	0,014300	FURIN	Protease	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B091347	1,670717611	0,047416	ADAM12	Metalloprotease	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B091387	1,667086578	5,12E-04	FGFR2	Growth factor	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B021059	1,63707423	0,006475	COL12A	Isoforme de collagene	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B065437	1,483094858	9,09E-04	VWFA domain-containing protein	Extracellular protein	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B052806	1,376406667	0,012934	VWFA domain-containing protein	Extracellular protein	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B090458	1,330344726	0,045734	VWFA domain-containing protein	Extracellular protein	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B020839	1,252972268	3,14E-05	VWFA domain-containing protein	Extracellular protein	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B010537	1,233477215	8,18E-04	Integrin_alpha2 domain-containing protein	Integrin Cell / Matrix interaction / Receptor	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B068602	1,144958799	9,60E-05	Protocadherin Fat 4	Cadherin Cell/Cell interactions	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B011044	1,057496555	0,010233	VWFA domain-containing protein	Extracellular protein	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B079362	1,007151667	0,028417	Temptin Fibropellin-3,Protein eyes shut,Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1,Delta-like protein C,Fibropellin-1,Delta-like protein D	Biomineralisation / Pheromone	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B079520	0,985782979	0,044142		Extracell Prot / matrix	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B026707	0,984834448	1,25E-04	Protocadherin Fat 4	Cadherin Cell/Cell interactions	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B050389	0,942329697	0,001403	VWFA domain-containing protein	Extracellular protein	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B074207	0,934845968	0,002566	Fibropellin-1	Extracell Prot / matrix	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B072009	0,878568965	0,001764	Putative mucin-5AC	Mucine	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B070111	0,868692383	0,009926	VWFA domain-containing protein	Extracellular protein	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B038094	0,830608038	4,54E-05	VWFA domain-containing protein	Extracellular protein	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B037461	0,815448439	0,029917	VWFA domain-containing protein	Extracellular protein	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B089577	0,797950715	0,032674	Tenascin-X	Extracell Prot / matrix	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B052747	0,722096495	0,047410	VWFA domain-containing protein	Extracellular protein	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B048588	0,699933986	0,011038	Pt2-cadherin	Cadherin Cell/Cell interactions	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B032173	0,695394108	0,034472	Integrin_alpha2 domain-containing protein	Integrin Cell / Matrix interaction / Receptor	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B063123	0,616562666	0,035479	Basigin	CD147 / ECM remodelling	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B076981	0,537592717	0,013377	Fibropellin-1	Extracell Prot / matrix	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B040954	0,506514117	0,006328	Fibronectin	ECM	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B038561	0,501674742	0,029866	COL13A	Isoforme de collagene	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B034453	0,459897483	0,041680	COL13A	Isoforme de collagene	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B004602	0,413539096	0,025132	ADAM17	Metalloprotease	Extra Cellular Matrix

MGAL_10B081460	0,375182216	0,030144	Integrin beta	Integrin Cell / Matrix interaction / Receptor	Extra Cellular Matrix
MGAL_10B093862	1,069021256	9,09E-04	Homeobox domain-containing protein	Cell differentiation / Development	Cell Differentiation
MGAL_10B086766	1,843809152	0,002301	GATA zinc finger domain-containing protein 14-like	Hematopoiesis/Cell differentiation	Cell Differentiation
MGAL_10B085492	0,335632353	0,033042	SCRIB	Wnt / b-Cat negative regulator Notch / Delta pathway Cell differentitaion / developement	Cell Differentiation
MGAL_10B091078	0,320582852	0,015227	NOTCH1		Cell Differentiation
MGAL_10B092501	0,258595702	0,020135	Homeobox protein cut-like	Cell differentiation / Development	Cell Differentiation
MGAL_10B092507	-1,29695629	0,002371	Homeobox domain-containing protein	Cell differentiation / Development	Cell Differentiation
MGAL_10B012107	6,124121954	0,017185	Death domain-containing protein	Apoptosis	Cell Death / Apoptosis
MGAL_10B062082	3,828460133	0,011740	Nuclear apoptosis-inducing factor 1	Apoptosis	Cell Death / Apoptosis
MGAL_10B030780	1,639279025	0,034160	CARD_2 domain-containing protein	Apoptosis / NLR ?	Cell Death / Apoptosis
MGAL_10B046358	1,179045361	0,021444	Death domain-containing protein	Apoptosis ?	Cell Death / Apoptosis
MGAL_10B080107	0,380373397	0,003026	CARD domain-containing protein	Apoptosis / NLR ?	Cell Death / Apoptosis
MGAL_10B073663	-0,569931683	0,037891	CARD domain-containing protein	Apoptosis / NLR ?	Cell Death / Apoptosis
MGAL_10B006939	0,541157025	0,033071	RRAS2	Ras GTPase / Cell cycle	Cell Cycle
MGAL_10B035274	0,452889168	0,045155	MAP kinase kinase kinase 1-like protein	Ras Effector	Cell Cycle
MGAL_10B001506	0,428224212	4,54E-05	Protein furry-like	Interact with Polo/Aurora Kinase / Mitosis	Cell Cycle
MGAL_10B077703	0,322105629	0,012128	Protein furry	Interact with Polo/Aurora Kinase / Mitosis	Cell Cycle
MGAL_10B018571	0,311813009	0,045337	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	Cycle cellulaire	Cell Cycle
MGAL_10B017265	0,28639601	0,020582	SOS	Ras GEF / Proliferation cellulaire	Cell Cycle
MGAL_10B034424	0,259761027	0,002937	SOS	Ras GEF / Proliferation cellulaire	Cell Cycle
MGAL_10B058219	0,247920569	0,014300	Cyclic nucleotide ras GEF	Ras GEF / Proliferation cellulaire	Cell Cycle

--- Discussion générale et perspectives ---

Au démarrage de cette thèse, les cancers transmissibles de bivalves venaient tout juste d'être mis en évidence et, hormis la description des différentes lignées de ces parasites unicellulaires eucaryotes si particuliers, peu de choses étaient connues sur la date d'émergence, l'évolution, la route de transmission, les interactions avec les hôtes ou encore la distribution des populations touchées par les différentes lignées. Pour le cas des moules *Mytilus*, l'existence d'un cancer transmissible d'origine *M. trossulus* avait été mis en évidence dans une population *M. trossulus* en Colombie Britannique (Metzger et al., 2016) et la présence de ce cancer avait été suspectée dans des populations *M. edulis* en Europe (Riquet et al., 2017). Au cours de cette thèse et après avoir participé à confirmer l'existence d'un cancer transmissible d'origine *M. trossulus* en Europe (Yonemitsu et al., 2019), j'ai pu explorer différentes questions pour mieux comprendre la biologie, l'écologie et l'évolution de ce cancer transmissible, ainsi que son interaction avec les populations d'hôtes. Si je devais résumer ces trois années, je dirais que les résultats de cette thèse ont permis de montrer (1) que les populations européennes sont touchées par une même lignée de cancer transmissible (MtrBTN2), qui est différente de celle de Colombie Britannique (MtrBTN1), (2) que la prévalence est globalement faible mais varie selon le fond génétique des hôtes et l'habitat, (3) que le trafic maritime semble créer des passerelles épidémiologiques entre les ports expliquant une plus forte prévalence dans ces habitats anthropisés, (4) que malgré une évolution clonale le MtrBTN2 est polymorphe, ce qui suggère une histoire évolutive complexe et possiblement ancienne qui a mené à l'évolution d'au moins deux sous-lignées en Europe, (5) que la dynamique d'invasion intra-hôte par le cancer semble dépendre de l'individu receveur et de l'individu donneur dans le cadre d'infections expérimentales et (6) que cette invasion semble induire chez les individus receveurs une réponse immunitaire majoritairement humorale et un remodelage tissulaire associé à une réponse inflammatoire prolongée. Pris un à un, ces éléments renseignent sur ce système hôte-cancer mais c'est en prenant la vision d'ensemble que l'on commence à mieux en comprendre la dynamique. Pour synthétiser le tout, je vais donc discuter les différents points clés de ces résultats, tout en exposant ma vision de la dynamique de ce système et les différentes perspectives qui en découlent.

1. La distribution et la prévalence, comme premiers indicateurs de la dynamique de ce système hôte-cancer.

La distribution des populations touchées par un parasite et les prévalences associées sont des paramètres importants qui permettent d'évaluer la sensibilité des hôtes, la virulence du parasite ainsi que les facteurs environnementaux, ou les préférences des hôtes (surtout dans le cas d'infection multi-

espèces), qui favorisent la transmission et la persistance du parasite. Le premier objectif de cette thèse a été de déterminer la répartition et la prévalence de MtrBTN2 dans les populations européennes, d'examiner l'existence potentielle d'autres lignées non décrites et de déterminer le fond génétique des hôtes affectés. Les résultats du **chapitre 1** montrent qu'il n'existe en Europe qu'une seule lignée de cancer transmissible d'origine *Mytilus trossulus*, que nous avons nommée MtrBTN2, et qu'elle se trouve en faible prévalence (<1%). De plus, il s'avère que l'espèce *M. edulis* n'est pas la seule touchée puisque des individus cancéreux ont également été retrouvés chez *M. galloprovincialis* et certains de leurs hybrides. Malgré une prévalence faible il est apparu que les populations *M. edulis* sont plus touchées (de l'ordre de 1/100) que celle de *M. galloprovincialis* (de l'ordre de 1/1000) avec une prévalence intermédiaire chez les hybrides. Ces résultats nous indiquent que le MtrBTN2 est capable d'infecter plusieurs espèces d'hôtes et que, basé sur les prévalences, *M. edulis* pourrait être plus sensible au cancer que *M. galloprovincialis*. Une faible prévalence ne reflète pas nécessairement une faible virulence d'un parasite. En effet, une virulence élevée causant de fortes mortalités peut rendre difficile l'estimation réelle de son incidence et peut également entraîner une faible prévalence. Cependant, le MtrBTN2 ne semble pas relié à des épisodes de mortalités de moules (Charles et al., 2020) et une analyse de 300 moules moribondes issues d'un événement de mortalité massif en 2015 n'a montré aucun signal de chimérisme génétique d'origine *M. trossulus* (Pepin et al., 2017). De plus, comme discuté dans le **chapitre 1**, *M. galloprovincialis* semble plus robuste que *M. edulis* (résistance à différents parasites et espèce mondialement invasive). Ceci suggère donc que la faible prévalence du MtrBTN2 est plutôt reliée à une faible virulence du cancer et que les différences entre les deux espèces reflètent des sensibilités variables des hôtes au MtrBTN2. Ces différences de sensibilité apparentes amènent donc à se questionner sur l'influence de la structuration spatiale des populations d'espèces hôtes dans la transmission et la persistance de MtrBTN2 et sur l'évolution de cette dynamique multi-hôte. En effet, si l'on admet une transmission de proche en proche (nous discuterons de cet aspect ultérieurement), il est alors possible que la présence de populations *M. galloprovincialis* puisse freiner, voir stopper, la propagation du cancer transmissible entre deux populations de *M. edulis* à large échelle. Dans un système multi-hôte pour lequel des prévalences sur une série temporelle longue étaient disponibles, il a été montré que malgré des capacités équivalentes du parasite *Anostracospira rigaudi* à infecter deux espèces d'hôtes (*Artemia franciscana* et *Artemia parthenogenetica*), l'absence de *A. parthenogenetica* ne permettait pas au parasite de persister dans les populations de *A. franciscana* (Lievens et al., 2019). Cela montre donc l'importance de la structure des communautés d'hôtes pour comprendre la persistance du parasite. Une manière de vérifier la contribution de chaque espèce hôte dans la

persistance du MtrBTN2 serait donc de vérifier si les cas de cancer chez *M. galloprovincialis* se trouvent majoritairement dans des populations où elle vit en sympatrie avec *M. edulis*. Cela va même plus loin puisque le MtrBTN2 est aujourd'hui connu pour affecter au moins 4 espèces du genre *Mytilus* à travers le monde : *M. trossulus* en mer du Japon (Skazina et al., 2021), *M. chilensis* en Patagonie (Yonemitsu et al., 2019), *M. edulis* (Burioli et al., 2019; Yonemitsu et al., 2019) et *M. galloprovincialis* en Europe (Hammel et al., 2021). Cette distribution questionne donc sur le rôle du facteur multi-hôte dans la persistance de cette lignée de cancer transmissible à l'échelle mondiale, et également sur les conditions qui ont permis ses passages. Cependant, les prévalences sont d'un même ordre de grandeur entre *M. trossulus*, *M. edulis* et *M. chilensis*, et c'est seulement *M. galloprovincialis* qui est moins affectée que les autres espèces, toujours en accord avec l'apparente robustesse de cette espèce invasive (Tolman et al., 2019). Si le débordement (*spillover*) depuis *M. edulis* pourrait expliquer la détection de MtrBTN2 dans les populations de *M. galloprovincialis*, coexistant en sympatrie avec *M. edulis* sur les côtes atlantiques françaises, notons que MtrBTN2 a été détecté en Méditerranée où *M. galloprovincialis* vit seule. Les espèces du genre *Mytilus* sont connues pour leur capacité à s'hybrider lorsqu'elles se rencontrent et de nombreuses zones hybrides entre ces différentes espèces sont décrites dans le monde entier (voir section 3.1 de l'introduction). On peut alors se demander si ces hybrides auraient pu faciliter les passages interspécifiques multiples du MtrBTN2. Néanmoins, la dynamique hôte-parasite ne dépend pas uniquement de la propagation du parasite ou de la répartition des hôtes susceptibles mais inclut également une part importante des facteurs environnementaux (ces trois composantes sont rassemblées sous le terme de « triangle épidémiologique »). Compte tenu des niches très variées que peuvent occuper les espèces du genre *Mytilus*, les facteurs environnementaux associés à chaque population pourraient donc également jouer un rôle important dans la propagation du MtrBTN2.

Les résultats du **chapitre 1** nous ont amenés à réaliser un échantillonnage à échelle plus fine dans une zone hybride mosaïque où les *M. edulis* et *M. galloprovincialis* coexistent et peuvent s'hybrider, mais peuvent également former des patchs homospécifiques disjoints (**chapitre 2**). Au-delà de la structuration spatiale en mosaïque des fonds génétiques, cette zone s'est avérée intéressante puisqu'elle abrite des habitats contrastés qui ont notamment été reliés à la répartition des deux espèces. Nous avons aussi saisi l'opportunité d'échantillonner un mélange de sites naturels sur l'estran et de sites anthropisés, avec des ports, des élevages et des bouées. Le criblage génétique⁸⁰ de plus de 1500 moules issues de 76 sites différents a révélé une prévalence globalement faible (23/1516) mais qui varie entre

⁸⁰ Par amplification PCR d'un marqueur nucléaire et d'un marqueur mitochondrial

les différents sites échantillonnés (allant de 1/124 à 8/20). Cette forte hétérogénéité entre sites pourrait être reliée aux facteurs environnementaux des sites et/ou être due à une densité variable d'hôtes sensibles qui pourrait à son tour être liée au fond génétique des hôtes, comme c'est le cas dans d'autres systèmes hôte-parasites (Bielby et al., 2021; Gibson, Jokela, & Lively, 2016). Du fait des différences de prévalence précédemment identifiées, il est probable que nous observions des différences de sensibilités au MtrBTN2 entre les deux espèces, mais on ne peut pas exclure de possibles différences de sensibilité au niveau intra-spécifique également. De plus, sachant qu'au moins deux sous-lignées de MtrBTN2 coexistent en Europe, il serait intéressant d'avoir accès à la structuration spatiale des génotypes cancéreux puisque, tout comme celle des hôtes, la diversité génétique des parasites influence leur capacité de propagation dans les populations hôtes (Ganz & Ebert, 2010; Papkou et al., 2019). Le génotypage des individus étant en cours, nous n'avons pas encore pu relier ces prévalences au fond génétique des hôtes et du cancer mais ce résultat nous apportera de précieuses indications sur la dynamique de ce système à fine échelle. Cependant, de manière inattendue, la majorité des sites touchés se sont avérés être des ports, dont un présentant une forte prévalence (8/20). Ce dernier pourrait représenter un « point chaud » d'autant plus qu'il s'agit d'un quai⁸¹ de navette touristiques connues pour desservir les ports avoisinants. Dans la majorité des bancs naturels, dont ceux directement hors des ports affectés, et la totalité des élevages et des bouées flottantes échantillonnées, aucun cas de MtrBTN2 n'a été détecté. Les seuls bancs naturels colonisés par le MtrBTN2 se sont avérés être proches du « point chaud », suggérant un effet de débordement (*spillover*) depuis ce site vers les populations naturelles. Les ports pourraient donc être des habitats favorables à la transmission du MtrBTN2 et/ou le transport maritime être un vecteur du cancer via le *biofouling*. Il est cependant important de noter que les sites qui présentent les prévalences les plus élevées s'apparentent à des écosystèmes en bonne santé avec une disponibilité en ressources importante, ce qui est loin de la vision classique d'un environnement portuaire pollué et fermé. On peut alors se demander si la transmission et le maintien du MtrBTN2 ne pourrait pas être favorisé dans des populations d'hôtes ayant accès à des ressources abondantes. En effet, une bonne nutrition des hôtes permet d'une part d'augmenter l'énergie disponible pour se défendre mais d'autre part augmente la quantité d'énergie exploitable par le parasite et donc la capacité de portage parasitaire. Un équilibre se met alors en place et il est possible qu'un environnement favorable accroisse la permissivité des hôtes et augmente les prévalences du parasite (Pike et al., 2019). Pour le MtrBTN2, il n'est à ce stade pas possible de distinguer l'effet de l'environnement de celui de la connectivité dans sa capacité à se propager et à persister. Les observations nous amènent tout de même

⁸¹ Il ne s'agit pas d'un port de plaisance mais d'un ponton à la sortie de l'estuaire de Guréande

à proposer que ces ports puissent jouer le rôle de carrefours épidémiologiques pour la propagation du MtrBTN2. Ces résultats ajoutent donc une composante importante dans la compréhension de la propagation du MtrBTN2 puisque la connectivité pourrait augmenter le potentiel de dispersion dans des populations auparavant non impactées, dans lesquelles les conditions des hôtes et celles de l'environnement détermineront ensuite la capacité de colonisation du cancer. Cela pourrait donc à terme favoriser la persistance du cancer à différentes échelles spatiales (locale, régionale, mondiale), comme c'est le cas pour d'autres parasites ou espèces à caractère invasif (Floerl, Inglis, Dey, & Smith, 2009; Fuhrmann et al., 2021; Georgiades et al., 2021).

2. Les infections expérimentales par injection de cellules MtrBTN2 renseignent sur la sensibilité et l'immunité des hôtes.

Les estimations de prévalence semblent indiquer différents degrés de sensibilité au MtrBTN2 entre les deux espèces d'hôtes en Europe, qui pourraient également être retrouvés au niveau intraspécifique. Les résultats d'histopathologie du **chapitre 3** nous indiquent que 25 jours après l'injection de cellules de MtrBTN2, les individus receveurs (exclusivement *M. edulis*) présentent des niveaux d'envahissement des tissus très variables allant de quelques cellules cancéreuses au point d'injection à l'invasion dans plusieurs organes. Ces observations peuvent en partie être interprétées comme des différences de sensibilité entre individus receveurs et indiqueraient donc l'existence d'une variabilité intraspécifique de la résistance au sein d'une même population d'hôtes. Bien que les bases moléculaires des différences de sensibilité apparentes restent à déterminer, l'analyse des données transcriptomiques semble pouvoir en partie les identifier, puisque certains profils d'expression de gènes sont spécifiques à certains des groupes pathologiques identifiés. De plus, l'analyse histologique montre une mobilisation des hémocytes au niveau des tissus atteints mais ne montre pas d'interactions directes avec les cellules cancéreuses. Ces observations corroborent les premiers résultats de l'analyse transcriptomique, qui ne semble pas montrer de réponse immunitaire cellulaire forte mais plutôt l'induction d'une réponse immunitaire majoritairement humorale associée à une réponse inflammatoire prolongée ainsi qu'à la réparation des tissus. Une réponse de type ROS a été retrouvée induite lors d'infection d'hôtes *M. edulis* par des macroparasites *Marteilia intestinalis* et, bien que considérée comme non-spécifique, cette réponse semblait être régulée selon l'origine du parasite et de l'hôte (allopatrie vs. sympatrie, Feis et al., 2018). Dans le cas de la réponse des hôtes au MtrBTN2, il serait également intéressant de pouvoir réaliser des infections croisées en mettant en contact des cellules

cancéreuses provenant de population géographiquement éloignées (par exemple Manche versus Atlantique) et de tester si une certaine adaptation locale des réponses des hôtes a lieu. Sachant que la dispersion du MtrBTN2 semble reliée en partie au trafic maritime, il est intéressant d'étudier la réponse d'une population face à l'arrivée du cancer pour pouvoir appréhender sa dynamique de propagation dans ces nouvelles populations. Dans certains systèmes hôtes-parasites, l'évolution vers une résistance au parasite est favorisée lorsque la population d'hôtes est isolée et les événements de migration (du parasite ou des hôtes) peuvent alors permettre au parasite de persister à long terme.

Dans le **chapitre 3**, le transfert du cancer par injection montre un taux de succès⁸² élevé qui augmente selon la dose administrée au départ. Ces observations montrent, qu'une fois entré le cancer semble pouvoir s'établir mais le degré d'envahissement varie entre les hôtes et révèle donc des différences de sensibilité. Néanmoins, la voie d'entrée naturelle du cancer (encore inconnue à ce jour) pourrait mettre en jeu d'autres composantes comme les barrières épithéliales et mucosales. En effet, ces barrières ont un rôle majeur dans la défense chez les bivalves avec par exemple une forte concentration de peptides antimicrobiens (AMPs) qui favorisent l'élimination des pathogènes avant même leur possible entrée dans l'individu exposé (Allam & Pales Espinosa, 2016; Allam & Raftos, 2015). Il a notamment été montré que les palourdes sont capables de résister à une très grande charge de bactérie *Vibrio tapetis* si elles y sont exposées par baignade (voie d'entrée naturelle), mais succombent à un nombre beaucoup moins important de ces mêmes bactéries si elles sont directement injectées dans les tissus (Allam, Paillard & Ford, 2002). D'un autre côté, le mucus semble pouvoir favoriser l'entrée de certains parasites, comme cela a été montré dans l'interaction entre l'huître *Crassostrea virginica* et son parasite *Perkinsus marinus* dans laquelle le mucus offre un environnement favorable à la réplication du parasite et favorise l'expression de gènes de virulence, ce qui facilite l'entrée du parasite via le circuit d'alimentation de l'huître (Allam et al., 2013; Espinosa et al., 2014). Quoi qu'il en soit, caractériser les rôles des épithalia et du mucus semble indispensable pour la compréhension de la dynamique d'infection des moules par le MtrBTN2 et semble nécessaire pour mesurer la résistance et la sensibilité des différentes populations d'hôtes en conditions naturelles. Pour cela, une première approche pourrait consister à déposer une forte charge de cellules de MtrBTN2 sur les branchies de différents individus (de populations différentes et/ou d'espèces différentes) et de réaliser ensuite des analyses histopathologiques et de transcriptomiques sur différents tissus tels que les branchies, le manteau, les palpes labiaux, la glande digestive et l'organe *plicata* afin d'évaluer les mécanismes d'invasion.

⁸² Le succès signifie que 25 jours après injection, des cellules cancéreuses sont observées chez les individus receveurs peu importe le degré d'envahissement des tissus.

3. Une histoire évolutive complexe qui renseigne sur des adaptations à la vie clonale.

Une composante importante dans l'étude de la dynamique hôte-parasite est la dimension temporelle de l'interaction dont l'observation actuelle résulte généralement de longues années de co-évolution. La distribution mondiale du MtrBTN2, dans 4 espèces du complexe d'espèces *Mytilus edulis*, ainsi que la divergence des haplotypes mitochondriaux et le polymorphisme nucléaire, suggèrent une émergence ancienne. Le seul autre cancer transmissible connu qui arbore une répartition mondiale est le CTVT du chien dont la date d'origine a été estimée de 4000 à 8000 ans (Baez-Ortega et al., 2019; Leathlobhair et al., 2018). Dans ce contexte, les informations portées par les séquences des génomes nous permettent d'accéder à l'histoire évolutive des organismes en témoignant notamment de l'action des différentes forces évolutives (mutation, sélection naturelle, dérive génétique et migration) qui ont pu façonner l'histoire passée des hôtes, des parasites et de leurs interactions. En plus de nous informer de la distribution et de la prévalence du MtrBTN2 en Europe, les analyses du **chapitre 1** nous ont permis de mettre en évidence un fort polymorphisme (30% des SNPs étudiés), l'existence de deux sous-lignées qui coexistent et se propagent dans les différentes populations d'hôtes et de possibles événements de capture mitochondriale. Ce fort polymorphisme observé sur seulement 74 SNPs diagnostiques entre les différentes espèces de *Mytilus* et un gène mitochondrial, est surprenant puisque les cancers transmissibles sont des lignées à évolution clonale, ce qui témoigne donc d'une histoire évolutive plutôt ancienne et complexe du MtrBTN2. L'accumulation de mutations aléatoires dans une lignée clonale, que ce soient des mutations ponctuelles ou structurales (perte et réarrangement chromosomique), résulte inéluctablement en une dégénérescence clonale, avec des pertes de fonctions essentielles à la survie de la cellule et une diminution des capacités de réponses à un stress, dus à l'accumulation progressive de mutations délétères. La clonalité pure représente ainsi une impasse évolutive à long terme. Pour contrecarrer cette fin inévitable les lignées clonales anciennes ont généralement trouvé des mécanismes pour en masquer les effets délétères par le biais d'hybridation rare, la pseudo-sexualité, et/ou la polyploïdisation. Dans le cas de la lignée clonale du MtrBTN2, au moins deux types d'adaptations possibles peuvent être proposées. La première pourrait être liée à des événements de captures mitochondriale suivie de recombinaison entre haplotypes mitochondriaux, qui pourraient diminuer les effets délétères de l'accumulation de mutations sur le génome mitochondrial haploïde. Les mitochondries ont un rôle central dans le métabolisme énergétique cellulaire. En effet, ces organites ont leur propre matériel génétique (ADN mitochondrial) et se répliquent de manière indépendante dans les cellules. Ce sont des entités sous un régime de sélection indépendant de celui de la cellule, qui peuvent

accumuler des mutations favorables à leur réplication mais néfastes pour la cellule (Aanen, Spelbrink, & Beekman, 2014). L'accumulation de mutations et la sélection positive d'haplotypes mitochondriaux égoïstes peuvent donc occasionner des dysfonctionnements dans les lignées cellulaires à long terme. Dans le CTVT du chien, plus d'une vingtaine de phénomènes indépendants de capture mitochondriale ont eu lieu tout au long de l'histoire évolutive de cette lignée cancéreuse (capture de mitochondrie de l'hôte par le cancer) et semblent avoir favorisé la persistance et la propagation du CTVT (Strakova et al., 2016, 2020). La deuxième adaptation possible pourrait provenir de successions d'évènements de duplication génomique au cours de l'histoire évolutive de MtrBTN2. En effet, la lignée de MtrBTN2 retrouvée en Europe a une forte ploïdie pouvant aller de 8N à 18N, soit en moyenne 4 à 9 fois plus élevée que la ploïdie d'une moule normale (Burioli et al., 2019; Charles, 2019). L'hyperploïdie peut être le résultat de multiples duplications du génome suite à des mitoses anormales successives. Ces dernières peuvent augmenter le nombre de copies homologues de gènes masquant ainsi les mutations délétères récessives et diminuant les risques de perte totale et délétère de copies de gènes lors de mutations structurales, mais peuvent également introduire une certaine hétérogénéité qui pourra être favorable à la survie du sous-clone produit. En effet, la duplication de génome, ou polyploïdie, est apparue de nombreuses fois au cours de l'évolution des organismes et a été montrée comme étant favorable face à un stress important par rapport à des cellules diploïdes (Schoenfelder & Fox, 2015; Van De Peer et al., 2017), y compris dans le cas de cancers non transmissibles humains multi-résistants et métastatiques (Amend et al., 2019; Pienta et al., 2020). Un fait intrigant dans le MtrBTN2 est la forte différence de ploïdie entre la lignée retrouvée chez *M. trossulus* en mer du Japon (4N, Skazina et al., 2021) et celle retrouvée chez *M. edulis* sur les côtes de la Manche (8-18N, Burioli et al., 2019). On peut alors se demander si une augmentation de la ploïdie aurait pu être directement favorable au passage du MtrBTN2 à une nouvelle espèce d'hôte. Il serait donc intéressant de pouvoir comparer les ploïdies de MtrBTN2 retrouvées chez *M. edulis* et *M. trossulus* avec celles retrouvées chez *M. chilensis* au Chili et *M. galloprovincialis* en Europe. De manière plus générale, l'étude de génomes complets provenant de MtrBTN2 d'origines géographiques différentes à l'échelle mondiale, nous permettrait de mieux comprendre son histoire évolutive et biogéographique, notamment par des analyses de phylodynamique comme cela a été utilisé pour retracer l'histoire de la propagation du DFTD du diable de Tasmanie (Patton et al., 2020).

La fusion cellulaire est un autre phénomène pouvant permettre au cancer de rebrasser son contenu génétique et qui pourrait également être à l'origine de l'hyperploïdie et des captures mitochondriales. Dans les cancers non-transmissibles, il a été démontré que la fusion spontanée entre

cellules tumorales ou avec des cellules de l'hôte entraîne une hétérogénéité tumorale qui augmente alors les capacités d'invasion et de migration des cellules cancéreuses ainsi que la résistance aux thérapies qui promeuvent les propriétés métastatiques des cellules tumorales (Amend et al., 2019; Noubissi & Ogle, 2016; Pienta et al., 2020). Il a également été montré que des phénomènes de recombinaison parasexuelle pouvaient se produire suite à la fusion spontanée entre cellules cancéreuses (Miroshnychenko et al., 2021). Bien que le fort polymorphisme du MtrBTN2, la ploïdie élevée et l'observation de cellules plurinucléées dans des individus cancéreux (Burioli et al., 2019) semblent indiquer que des phénomènes de fusion soient possibles, des expérimentations de mise en contact de cellules cancéreuses devront être menées pour conclure si la diversification du MtrBTN2 se produit en partie suite à de tels phénomènes.

4. Synthèse et perspectives

L'ensemble des résultats précédemment discutés indiquent que le MtrBTN2 est une lignée de cancer transmissible qui, depuis son émergence probablement ancienne, a su se maintenir dans les populations de multiples espèces hôtes à travers une histoire évolutive et biogéographique complexe. La dynamique entre MtrBTN2 et ses hôtes peut se regarder à différentes échelles de temps et d'espace, et chacune d'elles nous informent un peu plus sur les mécanismes de persistances et d'interactions de ce parasite avec son hôte. S'il a été difficile de le trouver puis de l'appivoiser, les expériences et les données acquises durant cette thèse nous permettent aujourd'hui de réorienter nos questions pour pouvoir aller explorer plus finement les processus en œuvre chez ce cancer transmissible. Une question centrale qui persiste toujours est celle de la transmission entre deux individus. Comment ces cellules cancéreuses sortent-elles de l'hôte ? Quelle quantité de cellules cancéreuses émises est nécessaire pour atteindre un ou plusieurs nouveaux hôtes ? La transmission nécessite-telle une certaine proximité entre les individus ? Quelles sont la ou les voies d'entrées de ce cancer transmissible ? Des essais de transmission par balnéation réalisés en laboratoire, mettant en contact une moule cancéreuse et une quarantaine de moules saines, n'ont pas été concluants (Charles, 2019). Il est donc probable que des éléments indispensables qui favorisent la transmission restent à identifier, autant du côté du nombre de propagules que des conditions physiologiques des hôtes. Une étude récente a montré que suite à un stress thermique, des hémocytes infectés par des bactéries pouvaient passer de l'hémolymphe à l'espace intervalvaire⁸³ avant d'être libérés dans l'eau de mer, survivre quelques heures et pénétrer dans

⁸³ Espace entre le manteau et la coquille

une moule naïve en favorisant la dissémination des bactéries (Caza et al., 2020). Ces résultats nous informent sur une possible voie de sortie par les cellules de MtrBTN2 et il serait donc intéressant de réaliser des prélèvements de liquide intervallaire sur des animaux cancéreux et évaluer cette hypothétique voie de sortie. Cependant, une observation qui me semble intrigante pour la question de la transmission par l'eau est la morphologie des cellules de MtrBTN2. En effet, ces cellules qui sont au moins quatre fois plus grosses que des hémocytes, présentent une forte densité (notamment du fait d'un rapport noyau/cytoplasme élevé) et sédimentent très rapidement lors de dépôt dans un tube ou directement dans la seringue de prélèvement (observations personnelles) alors que les hémocytes sains restent plus longtemps en suspension. Ces observations posent question quant à la possibilité du transport des cellules de MtrBTN2 par les courants marins sur de petites et longues distances, et il est donc très probable que la transmission du MtrBTN2 se fasse de proche en proche. A mon sens, une des premières choses qui pourrait être faite pour explorer les questions des voies de transmissions serait d'étudier la répartition spatiale des individus porteurs de MtrBTN2 à l'échelle d'une grappe de moules directement sur le terrain. Il serait alors intéressant de pouvoir marquer chaque individu en fonction de sa position dans la grappe avant de les cribler (en cytologie et en histologie pour la détection et la localisation de cellules cancéreuses suivies d'une validation génétique du MtrBTN2 par PCR) et de relier le statut cancéreux à l'emplacement des moules porteuses au sein de la grappe. Ce même suivi dans le temps apporterait des informations supplémentaires puisque les moules sont capables de se déplacer au sein d'une grappe. Tout en marquant les individus, il faudrait alors ajouter différents relevés de structuration spatiale avant de cribler et déterminer le statut cancéreux ou sain des individus et analyser les scénari de propagation du MtrBTN2 rétrospectivement. La répartition et la structuration spatiale des moules cancéreuses (contact direct entre moules cancéreuses ou répartition aléatoire au sein de la grappe) apporterait des indications sur la capacité de propagation des cellules cancéreuses d'une moule à l'autre. Les connaissances acquises au cours de cette thèse, qu'ils s'agissent des données de prévalence des différents sites touchés ou des méthodes de détection du MtrBTN2, nous permettent aujourd'hui d'envisager de telles expérimentations qui auparavant étaient difficilement concevables.

Au-delà des questions fascinantes que posent ces systèmes hôte-cancer, les cancers transmissibles sont également des modèles biologiques uniques pour aborder de nombreuses questions fondamentales de biologie. En effet, les cancers transmissibles permettent d'étudier les adaptations à la vie clonale avec l'originalité d'avoir un modèle pluricellulaire revenu secondairement à une vie unicellulaire parasitaire. En comparaison avec les cancers non-transmissibles il est alors possible de voir une évolution à long terme dont l'instabilité génétique semble diminuer avec le temps. Le retour à

l'unicellularité trouve de nombreux exemples le long de l'arbre du vivant mais les cancers transmissibles sont les seuls exemples de transitions survenus après plusieurs milliers d'années d'évolution ayant conduit à une organisation multicellulaire complexe. On peut alors se demander quels mécanismes évolutifs sont à l'œuvre lors de cette transition mais également si à terme de tels parasites pourraient éventuellement retrouver un mode de vie autonome ou même faire le chemin inverse de retour à la multicellularité.

--- Annexe 1 ---

**Article 3 : A single clonal lineage of transmissible cancer
identified in two marine mussel species in South
America and Europe**

A single clonal lineage of transmissible cancer identified in two marine mussel species in South America and Europe

Marisa A Yonemitsu¹, Rachael M Giersch¹, Maria Polo-Prieto², Maurine Hammel³, Alexis Simon³, Florencia Cremonte⁴, Fernando T Avilés⁵, Nicolás Merino-Véliz⁵, Erika AV Burioli⁶, Annette F Muttray⁷, James Sherry⁸, Carol Reinisch⁸, Susan A Baldwin⁹, Stephen P Goff^{2,10}, Maryline Houssin^{6,11}, Gloria Arriagada⁵, Nuria Vázquez⁴, Nicolas Bierne³, Michael J Metzger^{1*}

¹Pacific Northwest Research Institute, Seattle, United States; ²Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, United States; ³ISEM, Univ Montpellier, CNRS-EPHE-IRD, Montpellier, France; ⁴Laboratorio de Parasitología (LAPA), Instituto de Biología de Organismos Marinos (IBIOMAR) (CCT CONICET - CENPAT), Puerto Madryn, Argentina; ⁵Instituto de Ciencias Biomedicas, Facultad de Medicina y Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andres Bello, Santiago, Chile; ⁶Research and Development, LABÉO Frank Duncombe, Saint-Contest, France; ⁷Environmental Resources Management, Vancouver, Canada; ⁸Water Science & Technology Directorate, Environment and Climate Change Canada, Burlington, Canada; ⁹Chemical and Biological Engineering, University of British Columbia, Vancouver, Canada; ¹⁰Department of Microbiology and Immunology, Columbia University Medical Center, New York, United States; ¹¹FRE BOREA, MNHN, UPMC, UCN, CNRS-7208, IRD-207, Université de Caen Normandie, Caen, France

*For correspondence:
metzgerm@pnri.org

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 17

Received: 18 April 2019

Accepted: 23 September 2019

Reviewing editor: Elaine Ostrander, National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, United States

© Copyright Yonemitsu et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract Transmissible cancers, in which cancer cells themselves act as an infectious agent, have been identified in Tasmanian devils, dogs, and four bivalves. We investigated a disseminated neoplasia affecting geographically distant populations of two species of mussels (*Mytilus chilensis* in South America and *M. edulis* in Europe). Sequencing alleles from four loci (two nuclear and two mitochondrial) provided evidence of transmissible cancer in both species. Phylogenetic analysis of cancer-associated alleles and analysis of diagnostic SNPs showed that cancers in both species likely arose in a third species of mussel (*M. trossulus*), but these cancer cells are independent from the previously identified transmissible cancer in *M. trossulus* from Canada. Unexpectedly, cancers from *M. chilensis* and *M. edulis* are nearly identical, showing that the same cancer lineage affects both. Thus, a single transmissible cancer lineage has crossed into two new host species and has been transferred across the Atlantic and Pacific Oceans and between the Northern and Southern hemispheres.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.001>

Introduction

Cancers normally arise from mutations in an organism's own cells, and they either regress or continue to grow until they kill the host organism. In a few cases, however, including Tasmanian devils ([Pearse and Swift, 2006](#); [Pye et al., 2016](#)), dogs ([Murgia et al., 2006](#); [Rebbeck et al., 2009](#)), and bivalves ([Metzger et al., 2016](#); [Metzger et al., 2015](#)), cancer cells naturally transfer from one animal to another as an infectious allograft, leading to lineages of transmissible cancer that spread through

eLife digest : Cancer cells can grow and spread in one individual, but they normally do not spread to others. There are a few exceptions to this rule. For example, there are cancers in Tasmanian devils, dogs and bivalve shellfish that can spread to other members of the same species. In these creatures, cancer from one individual evolved the ability to spread throughout the population. These cancer cells infect animals like a pathogen.

A fatal cancer called disseminated neoplasia affects many species of bivalves. Scientists have shown it can spread in four mussel species, including the marine mussel, *Mytilus trossulus*. This transmissible cancer has been found in *M. trossulus* mussels in British Columbia, Canada; but related species of mussels in other parts of the world also develop disseminated neoplasia. It is possible these cancers are related or have spread from one population of mussels to another.

Yonemitsu et al. performed genetic analyses to show that cancers found in two other mussel species – *Mytilus chilensis* in South America and *Mytilus edulis* in Europe – are transmissible and started in *M. trossulus*. The cancers in the South American and European mussels were nearly identical genetically, which suggests that they came from a single *M. trossulus* mussel with cancer at some point in the past. Somehow cancer cells spread between the Northern and the Southern Hemispheres and across the Atlantic Ocean, infecting many species across the world. The analyses also show that this cancer lineage is different from the one previously identified in British Columbia.

These analyses show that bivalve transmissible neoplasia was able to spread worldwide, most likely through accidental transport of infected mussels on international shipping vessels. This suggests that human activities unwittingly introduced the disease to new areas. Learning more about transmissible cancers may help scientists understand how cancers evolve with their hosts in extreme situations.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.002>

the populations (**Metzger and Goff, 2016**). In bivalves, disseminated neoplasia (also called hemic neoplasia) is a leukemia-like disease that has been found in more than a dozen marine species, characterized by an amplification of rounded, polyploid cells in the hemolymph of animals that infiltrate into tissues. This disease often occurs in outbreaks and has led to significant population losses in many bivalve species (**Barber, 2004; Carballal et al., 2015**). Pollution and retroviruses had been investigated as suspected causes, but until recently the etiology of disseminated neoplasia in bivalves was unknown. In four of the bivalve species affected by disseminated neoplasia (soft-shell clams, *Mya arenaria*; cockles, *Cerastoderma edule*; golden carpet shell clams, *Polinitapes aureus*; and bay mussels, *Mytilus trossulus*), recent investigation has shown that the diseases are bivalve transmissible neoplasias (BTNs), showing that transmissible cancer may, in fact, be a common phenomenon in marine invertebrates.

Disseminated neoplasia has been reported in marine mussels as early as 1969 (**Farley, 1969**), and has been observed consistently throughout Europe in both *M. edulis* (**Green and Alderman, 1983; Lowe and Moore, 1978; Rasmussen, 1986**) and *M. galloprovincialis* (**Ciocan and Sunila, 2005; Carella et al., 2013; Gombač et al., 2013**), albeit at lower prevalence than has been observed in some *M. trossulus* populations, which reached >20% in some locations in the 1980 s and was associated with population losses (**Barber, 2004; Bower et al., 1994**). Mussels in the genus *Mytilus* form a complex of species, including *M. trossulus*, *M. edulis*, and *M. galloprovincialis*, native to the northern hemisphere, and *M. chilensis*, *M. platensis*, and *M. planulatus*, native to the southern hemisphere (**Zbawicka et al., 2018**). These species have an anti-tropical distribution, spanning the temperate waters of the world, and they can hybridize, leading to widespread introgression of allospecific alleles (**Fraïsse et al., 2016**) as well as hybrid zones in several locations (**Bierne et al., 2003**). Disseminated neoplasia has been reported in four of these *Mytilus* species across multiple continents (**Barber, 2004; Carballal et al., 2015**), but so far the only lineage of disseminated neoplasia in the genus that has been directly confirmed to be a transmissible cancer is in *M. trossulus* along the Pacific coast of British Columbia (BC), Canada (**Metzger et al., 2016**).

A population genetics analysis of *M. edulis* from France, conducted to detect hybridization and introgression between *Mytilus* species by detecting species-specific SNPs, identified a few

individuals with unexpected 'chimeric' signals. The DNA samples from these individuals included *M. trossulus* alleles in a population where that species was absent, and the ratio of the *M. edulis* and *M. trossulus* alleles were not consistent with a diploid hybrid genome. Instead, this could be better explained by a mixture of two genotypes (one *M. edulis* and one *M. trossulus* in origin) within a single individual (Riquet et al., 2017). This suggested the hypothesis that *M. edulis* in France are affected by a BTN originating from *M. trossulus*, possibly the same lineage as previously identified in Canada. More recently, analysis of a severe mass mortality event (Benabdelmouna and Ledu, 2016) in French mussels that began in 2014 led to the observation of disseminated neoplasia in many populations of *M. edulis* and *M. galloprovincialis* (Benabdelmouna et al., 2018), although it has not yet been determined whether this neoplasia is transmissible.

M. chilensis mussels are found along the western coast of South America, and disseminated neoplasia has been reported in multiple populations in Chile and Argentina since 1998 (Lohrmann et al., 2019; Cremonte et al., 2015; Campalans et al., 1998; Cremonte et al., 2011). Prevalence has varied by location, ranging from undetectable in some populations to as high as 12% in the Castro region of Chile and 13% in the Beagle Channel in southern Argentina, although no notable mass mortality events have been associated with neoplasia in these populations.

We investigated disseminated neoplasia found in *M. chilensis* from Argentina and Chile, as well as *M. edulis* from France and the Netherlands, to determine if these cancers are transmissible cancers or conventional cancers and, if transmissible, whether these cancers represent new cases of the same lineage of transmissible cancer previously reported in Canada (here termed *Mytilus* BTN1) or whether they are novel cancer lineages. *Mytilus* BTN1 was able to be distinguished from normal *M. trossulus* genotypes at both a nuclear and mitochondrial locus (Metzger et al., 2016). Through analysis of multiple genetic markers in South American *M. chilensis* and European *M. edulis* individuals, we found evidence of transmissible cancer in both populations. We found that neither cancer matched the *Mytilus* BTN1 lineage, previously found in BC *M. trossulus*, but instead the cancers in both species appear to come from a single, previously unidentified transmissible cancer, here called *Mytilus* BTN2 or *Mtr*BTN2. This BTN lineage arose from an *M. trossulus* individual, and it has since crossed into two different *Mytilus* species and is now affecting animals across both the Atlantic and Pacific Oceans and in both the Northern and Southern Hemispheres.

Results

Transmissible neoplasia in *M. chilensis*

To determine whether the disseminated neoplasia in *M. chilensis* was due to a conventional cancer or a transmissible cancer lineage, we collected 60 *M. chilensis* animals from Ushuaia, Argentina in 2012. Histological analysis was used to diagnose the animals for the presence of disseminated neoplasia, and we observed a disease prevalence of 10%. DNA was extracted from tissues of three diseased animals and three normal animals, and an intron-spanning region in the nuclear gene Elongation Factor one alpha (*EF1 α*) was amplified and sequenced. A normal individual would be expected to have one or two alleles (depending on whether it was homozygous or heterozygous at that locus), and a cancer would be expected to have its own set of alleles, derived from its original host. All three normal animals had one or two alleles, as expected, but two of the diseased animals (Mch41 and Mch42) had four distinct alleles, consistent with a mixture of two host alleles and two cancer-specific alleles (Figure 1A). Notably, each diseased sample had two alleles that were unique (corresponding to host alleles), but two alleles from animal Mch41 were nearly exact matches to two alleles from Mch42 (here notated as G and H). This is consistent with the presence of a transmissible cancer containing alleles G and H. These cancer-associated alleles were not cloned from one of the three diseased animals (Mch23), but cloning of PCR products is not very sensitive. This individual either does not have this cancer lineage or has a lower level of cancer that was not detectable with this method.

A second collection of farmed *M. chilensis* from two locations in Chile confirmed the presence of disseminated neoplasia in these populations (9.6% in Calbuco and 4.5% in Castro). *EF1 α* alleles cloned from a diseased individual from this location exactly match the G and H cancer-associated sequences from Argentina.

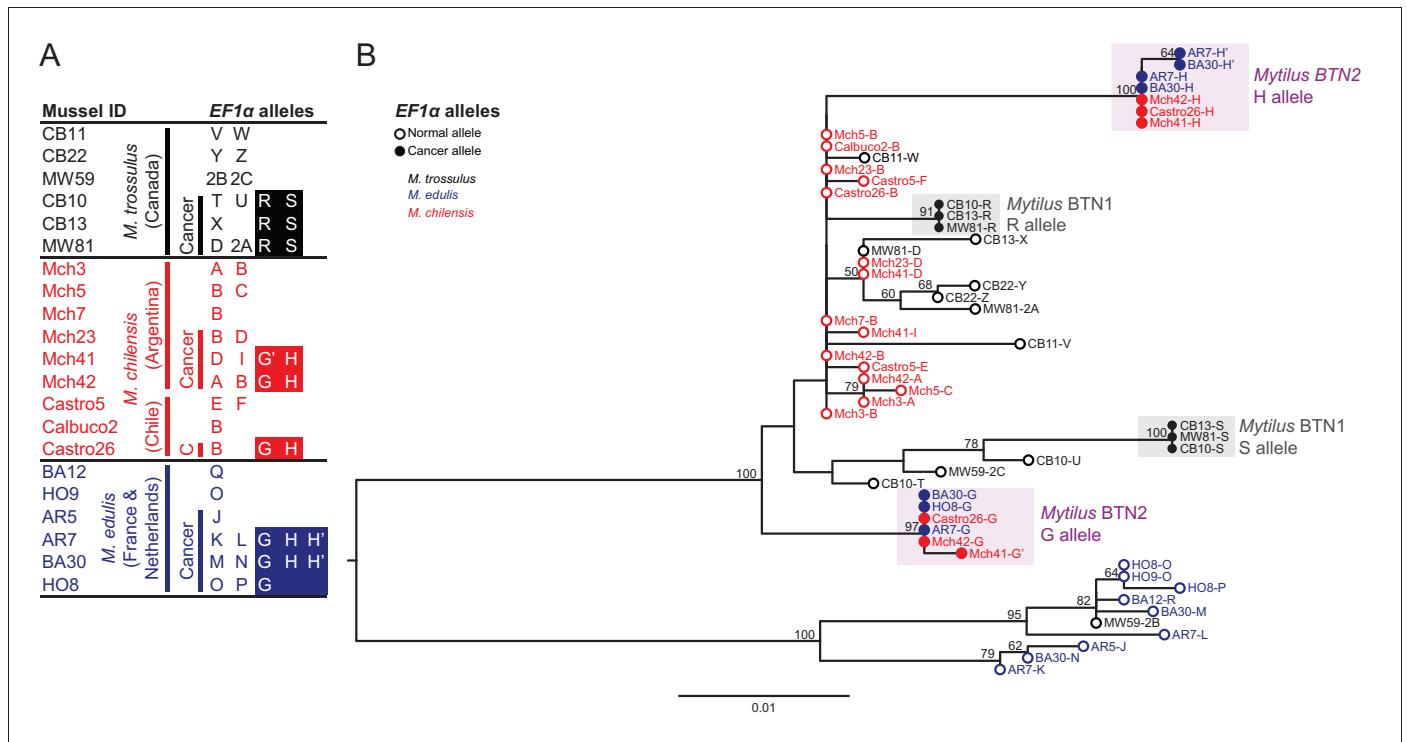


Figure 1. Phylogenetic analysis of *EF1α* alleles from normal and diseased mussels. The *EF1α* locus was amplified, and multiple alleles were cloned from different individual normal and diseased mussels of different species and locations: *M. trossulus* from BC (black), *M. chilensis* from Argentina and Chile (red), and *M. edulis* from France and the Netherlands (blue). (A) A list of cloned alleles is shown, with filled boxes marking cancer-associated alleles. (B) Phylogenetic analysis of aligned alleles shows groups of related alleles (see **Figure 1—source data 1**). Names of alleles on the tree specify individual ID and allele ID. Open circles mark alleles from normal individuals and host alleles from diseased individuals. Filled circles mark cancer-associated alleles on the tree (colored by host species). The tree was rooted at the midpoint, with bootstrap values below 50 removed. Model used was HKY85+G. The scale bar marks genetic distance.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.002>

The following source data is available for figure 1:

Source data 1. FASTA formatted text file of *EF1α* sequence alignment.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.003>

Phylogenetic analysis of these putative cancer-associated alleles shows that they are likely of *M. trossulus* or *M. chilensis* origin (**Figure 1B**). However, both cancer-associated alleles are clearly distinct from normal *M. trossulus* individuals and distinct from either allele of the previously identified BC transmissible neoplasia, *Mytilus* BTN1. Additionally, phylogenetic analysis shows that the *EF1α* S allele from *Mytilus* BTN1 (previously termed the ‘minor’ allele) is closely related to a subset of normal *M. trossulus* alleles. Thus, the tree is incompatible with the cancer-associated G and H alleles arising from the same cancer lineage as the *Mytilus* BTN1 S allele, although analysis of additional loci is needed to confirm this finding. The BTN found in *M. chilensis* therefore likely represents a separate, independent lineage of transmissible cancer, here called *Mytilus* BTN2.

Common transmissible cancer lineage in *M. chilensis* and *M. edulis*

The first evidence that disseminated neoplasia in European *M. edulis* was a BTN was the observation of ‘chimeric’ signals in a SNP detection assay, in which SNPs specific for *M. trossulus* were detected in five *M. edulis* samples out of 938. Additionally, the *M. trossulus* SNPs were detected at intermediate fluorescence ratio that could not be explained by an individual that was homozygous or heterozygous at those loci (i.e. variant allele fractions were not close to 50% or 100%) (**Riquet et al., 2017**). We sequenced the *EF1α* alleles present in DNA from four of these ‘chimeric’ samples of *M. edulis* collected from locations on the Atlantic coast of Europe and found more than the normal two

alleles in three of them (**Figure 1A**). Only one or two alleles were observed in normal *M. edulis* from the same populations. Two alleles were shared in more than one diseased sample, suggesting that they could be from a transmissible cancer. Unexpectedly, these two cancer-associated alleles found in diseased *M. edulis* did not match the previously reported *Mytilus* BTN1 lineage, found in *M. trossulus* in Canada, but instead exactly matched those found in cancer samples from *M. chilensis* in South America (*Mytilus* BTN2) (**Figure 1B**).

In these European *M. edulis* cancer samples, we found alleles identical to the G allele from *M. chilensis* and two nearly identical versions of the H allele, with only one SNP between them (termed H'). Both the H and H' alleles were represented by multiple clones and found in multiple individuals, so H' likely represents a true second copy of the H allele within the cancer cells. Disseminated neoplasia is polyploid, and this result is consistent with a de novo mutation which occurred in one copy of the H allele after genome duplication (and likely after divergence of the South American and European strains of this lineage).

Confirmation of cancer lineage identity with nuclear and mitochondrial loci

To gain more information about identity of the cancer lineage, we sequenced three additional loci using primers which amplify alleles in all three *Mytilus* species tested here. Histone 4 (*H4*) is a conserved gene present in multiple copies in the nuclear genome (*Eirín-López et al., 2004*). We amplified and cloned alleles from *M. chilensis* and *M. edulis* samples, as done with *EF1 α* . We observed 2–5 alleles in diseased samples and only 1–2 in normal samples (**Figure 2A**). Looking only at normal alleles, there is a clear grouping based on species of origin in a phylogenetic tree (**Figure 2B**). There are three exceptions to this clustering, from one normal *M. trossulus* (MW59) and two diseased *M. chilensis* (Mch41 and Castro26) with some distinctly *M. edulis*-like alleles. These may reflect introgression or true hybrid individuals—MW59 also has an *EF1 α* allele corresponding to *M. edulis* and likely represents a hybrid with this species, which has been introduced into Canada (*Crego-Prieto et al., 2015*).

Two sets of cancer-associated alleles were identified from both *M. chilensis* and *M. edulis*, which group together. As with *EF1 α* , the alleles associated with cancer in *M. chilensis* and *M. edulis* are distinct from the sequences of *Mytilus* BTN1 found in *M. trossulus* from Canada. Overall, the *H4* locus has less variability than the *EF1 α* locus. Notably, there are alleles found in normal *M. trossulus* individuals that are exact matches to alleles found in both *Mytilus* BTN1 and *Mytilus* BTN2. These data again argue that this newly identified cancer lineage has an independent *M. trossulus* origin and that it arose from a different *M. trossulus* individual than the one that gave rise to *Mytilus* BTN1. *Mytilus* BTN1 likely arose within an *M. trossulus* individual with a 2A *H4* allele and *Mytilus* BTN2 arose from a different *M. trossulus* individual which carried both MR-like and KNS-like alleles.

In addition to the nuclear loci, we also amplified a control region of the mitochondrial genome (mtCR) including large subunit ribosomal RNA (16S rRNA), a variable domain, and conserved domain (*Burzyński et al., 2006*). As *Mytilus* mussels have double uniparental inheritance of mitochondria (in which all individuals inherit mitochondria maternally, but a second male-specific lineage of mitochondria is also passed down to male offspring gonads), we amplified a female allele from all individuals, and both female and male alleles from about half of the individuals (10 of 21 total) (**Figure 3A**). The sequences of normal *M. trossulus* and *M. edulis* are similar to previously published reference sequences from those species. In addition, we amplified a *M. trossulus*-like allele from cancer samples from both *M. edulis* and *M. chilensis*. This allele (termed 'D') is mostly female-like, but it switches to male-like sequence at the 3' end (**Figure 3B**). This recombinant sequence closely matches a recombinant sequence previously reported in a Baltic *M. trossulus* individual (*Śmietanka and Burzyński, 2017; Zbawicka et al., 2014*). Interestingly, a second *M. trossulus*-like allele (C) was found in all three cancer samples of *M. chilensis*, which also represents a recombination between female and male sequences, but with a different recombination point than the first. This argues for heteroplasmy of the cancer cells in *M. chilensis*, and either loss of this heteroplasmy in the cancer lineage infecting *M. edulis* or capture of this new mitochondrial genome in the cancer lineage infecting *M. chilensis*. These unique recombinants between female and male sequences again argue that *Mytilus* BTN1 and BTN2 represent distinct lineages of cancer. Even when considering only the region without any recombination with the male sequence (**Figure 3C**), both of these mitochondrial alleles are distinct from those found in normal animals and from the previously identified *Mytilus* BTN1 lineage, and the

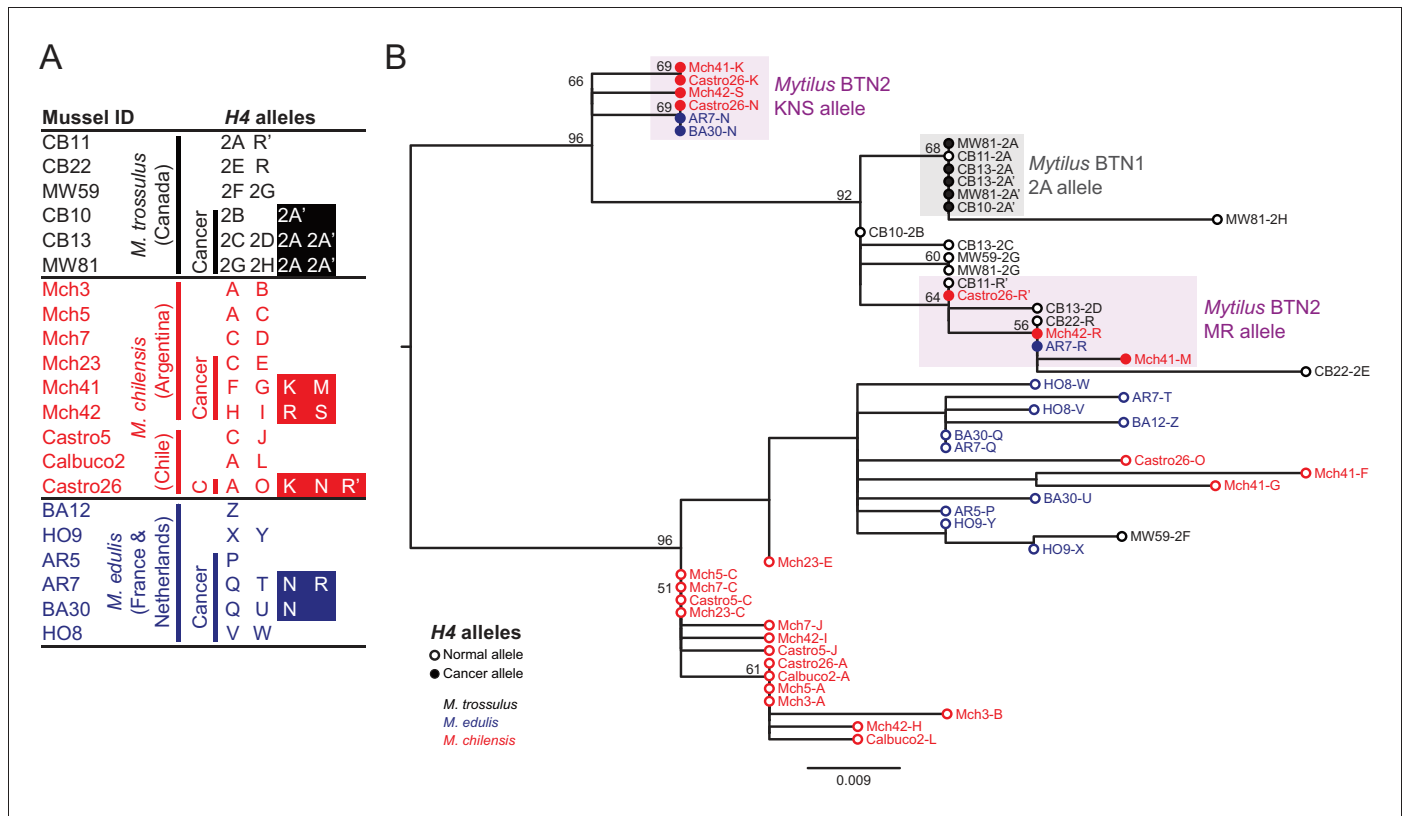


Figure 2. Phylogenetic analysis of *H4* alleles from normal and diseased mussels. The *H4* locus was amplified, and multiple alleles were cloned from different individual normal and diseased mussels of different species and locations: *M. trossulus* from BC (black), *M. chilensis* from Argentina and Chile (red), and *M. edulis* from France and the Netherlands (blue). (A) A list of cloned alleles is shown, with filled boxes marking cancer-associated alleles. (B) Phylogenetic analysis of aligned alleles shows groups of related alleles (see **Figure 2—source data 1**). Names of alleles on the tree specify individual ID and allele ID. Open circles mark alleles from normal individuals and host alleles from diseased individuals. Closed circles mark cancer-associated alleles (colored by host species). The tree was rooted at the midpoint, with bootstrap values below 50 removed. Model used was HKY85+I. The scale bar marks genetic distance. Three sequences (AR7-2I, BA30-2J, and Castro26-2J) are consistent with recombination between the two cancer-associated alleles and were removed from the tree for clarity. The two alleles identified in the *Mytilus* BTN1 lineage (2A and 2A') are distinguished by a unique single base deletion in 2A', which does not show up as a difference in the tree, as gaps are treated as missing data.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.004>

The following source data is available for figure 2:

Source data 1. FASTA formatted text file of *H4* sequence alignment.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.005>

phylogenetic tree suggests that *Mytilus* BTN1 and BTN2 arose from different *M. trossulus* individuals.

We additionally sequenced a second region in the mitochondrial DNA, the cytochrome c oxidase I gene (*COI*). Standard 'universal' molluscan primers used for barcoding (Folmer et al., 1994) did not amplify the mt*COI* allele from *Mytilus* BTN2, but by using degenerate primers flanking the region, we were able to amplify and sequence mt*COI* from all samples (Figure 4A, Supplementary file 1). The mt*COI* of the male-specific mitogenome was not amplified by these primers. We identified a clear separation of the mitogenomes of all three species, with the mt*COI* from both *Mytilus* BTN1 and 2 nested within the *M. trossulus* sequences, as with the three other loci tested (Figure 4B). The *Mytilus* BTN1 allele (U) again showed clear differences from the *Mytilus* BTN2 allele (B). As in the mitochondrial control region, the closest published sequence to the *Mytilus* BTN2 allele is the sequence from 62mc10, a normal *M. trossulus* from the Baltic region. This again provides evidence that the two lineages of transmissible cancer arose from distinct *M. trossulus* individuals.

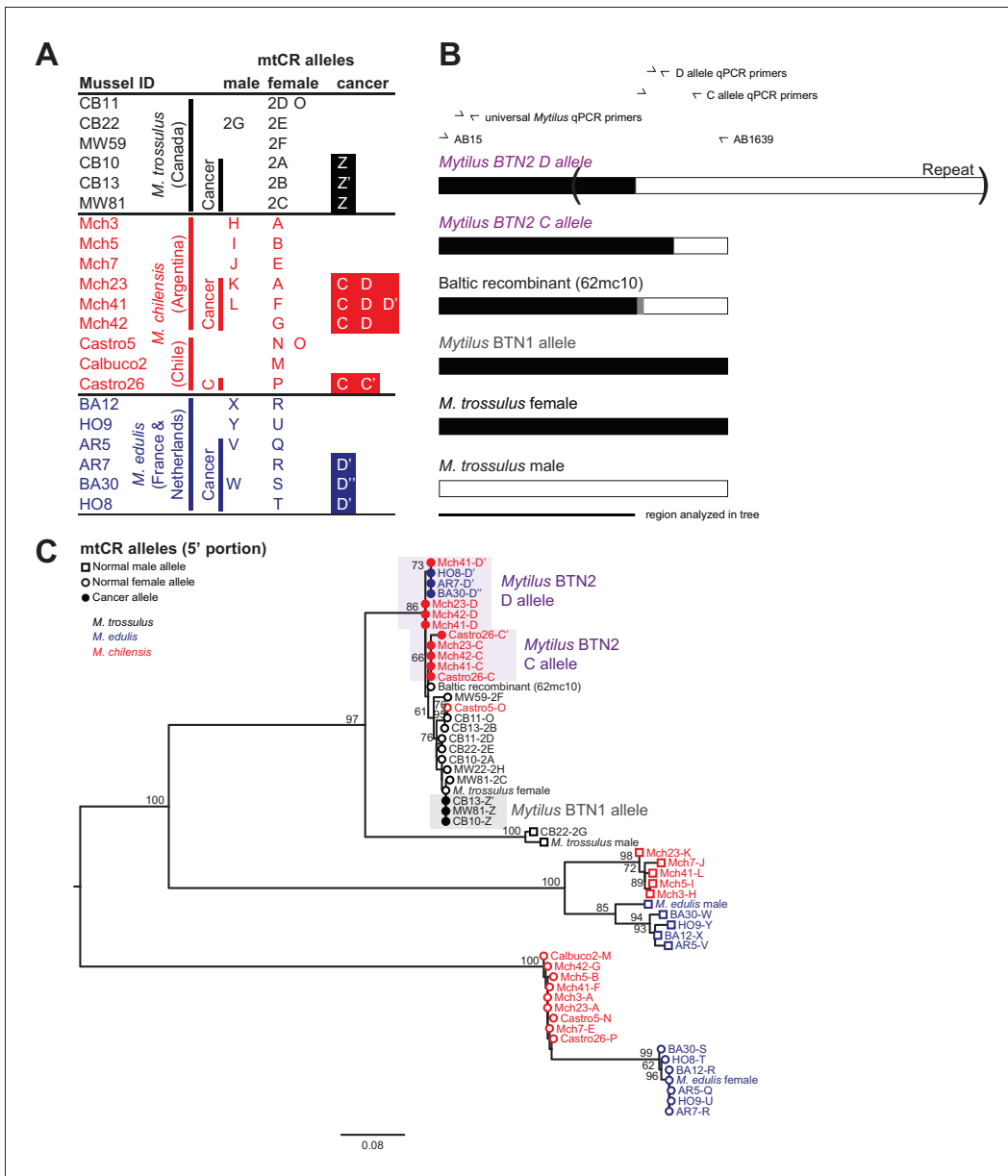


Figure 3. Phylogenetic analysis of mitochondrial CR alleles from normal and diseased mussels. The CR region of mitochondrial DNA was amplified, and multiple alleles were cloned from different individual normal and diseased mussels of different species and locations: *M. trossulus* from BC (black), *M. chilensis* from Argentina and Chile (red), and *M. edulis* from France and the Netherlands (blue). (A) A list of cloned alleles is shown, with filled boxes marking cancer-associated alleles. (B) A schematic of the rearrangement found in the cancer-associated alleles is shown with white boxes representing female-derived sequence and black boxes representing male-derived sequence (gray bars represent the likely recombination region). Parentheses mark the repeat region in allele D. (C) Phylogenetic analysis of aligned alleles shows groups of related alleles (see **Figure 3—source data 1**). Names specify individual ID and allele ID. Alleles from normal individuals and host alleles from diseased individuals are marked with open circles (female allele) and open squares (male allele). Closed circles mark cancer-associated alleles (colored by host species). The tree was rooted at the midpoint, with bootstrap values below 50 removed. Model used was GTR+I. The scale bar marks genetic distance. Multiple male alleles were identified in *M. chilensis* samples, and a representative with the greatest number of clones was chosen for each individual. Reference sequences include female *M. trossulus* (AY823625.1), male *M. trossulus* (HM462081.1), female *M. edulis* (DQ198231.2), male *M. edulis* (AY823623.1), and the *M. trossulus* recombinant 62cm10 (KM192133.1).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.006>

The following source data is available for figure 3:

Source data 1. FASTA formatted text file of mtCR sequence alignment.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.007>

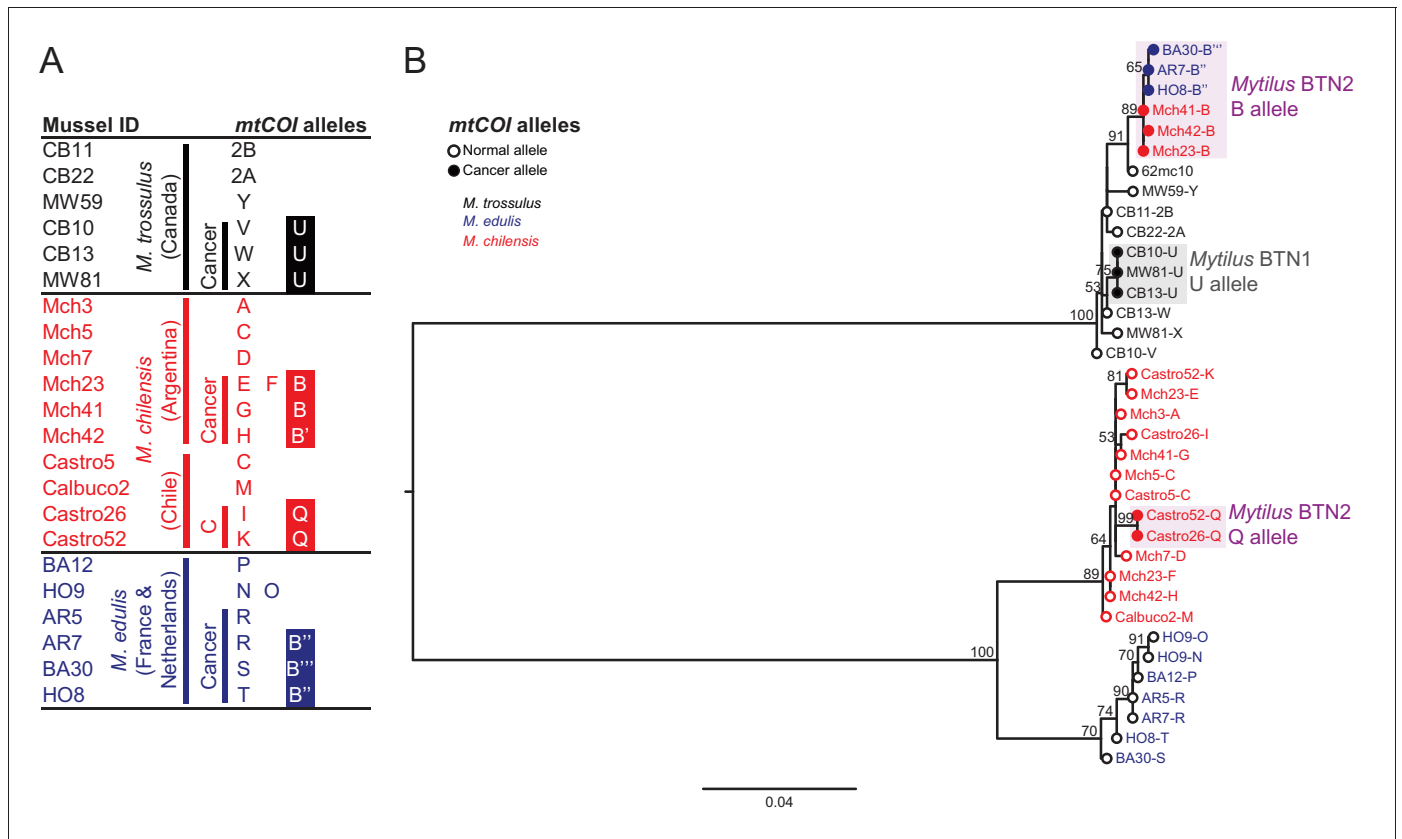


Figure 4. Phylogenetic analysis of mitochondrial *COI* alleles from normal and diseased mussels. The mt*COI* locus was amplified, and multiple alleles were cloned from different individual normal and diseased mussels of different species and locations: *M. trossulus* from BC (black), *M. chilensis* from Argentina and Chile (red), and *M. edulis* from France and the Netherlands (blue). (A) A list of cloned alleles is shown, with filled boxes marking cancer-associated alleles. (B) Phylogenetic analysis of aligned alleles shows groups of related alleles (see **Figure 4—source data 1**). Names of alleles on the tree specify individual ID and allele ID. Open circles mark alleles from normal individuals and host alleles from diseased individuals. Closed circles mark cancer-associated alleles (colored by host species). The tree was rooted at the midpoint, with bootstrap values below 50 removed. Model used was GTR+G. The scale bar marks genetic distance. An additional Chilean sample was used for cloning (Castro52) as Castro26 showed difference from the other samples at this locus and a second sample was needed to infer the cancer-associated allele and confirm the mitochondrial replacement. One clone obtained from Castro26 was a recombinant between a *M. trossulus*-like sequence and an *M. chilensis*-like sequence, and it was excluded from the phylogenetic tree for clarity.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.008>

The following source data is available for figure 4:

Source data 1. FASTA formatted text file of mt*COI* sequence alignment.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.009>

Unexpectedly, while the B allele was found in *Mytilus* BTN2 samples from both Europe and Argentina, it was not identified in the *M. chilensis* samples from Chile. In these two samples, two mt*COI* alleles were found, and they share a common allele that is likely to be the cancer-associated allele (Q). However, this allele is different from allele B, and it is *M. chilensis*-derived. These samples show evidence of the common *Mytilus* BTN2 alleles at all other nuclear and mitochondrial loci, so this suggests that there has been recombination between cancer and host mitochondria somewhere in the *M. chilensis* population, resulting in a subset of *Mytilus* BTN2 cells in Chile with new recombinant mitogenomes.

While two alleles (C and D) were identified in the *M. chilensis* mtCR region, only one allele was detected at mt*COI*. The control region alleles C and D were very similar, with the exception of a different recombination site with the male-like sequence, so it is likely that both mitogenomes have the same sequence at the more conserved *COI* locus. Additionally, in Castro26, a second recombinant

sequence was identified that was composed of half *M. trossulus* sequence and half *M. chilensis* sequence. This could represent the second cancer mitogenome (i.e. mtCR D and mtCOI Q could be on one mitogenome and mtCR C and the recombinant mtCOI could be the other), but it was supported by a single clone, so it is unclear if it was a PCR artifact or a true second allele. Further analysis will be required to determine the full recombinant cancer mitogenomes in the *Mytilus* BTN2 cancers in this region of Chile.

Detection of trans-oceanic cancer in multiple populations of *M. chilensis* and *M. edulis* using qPCR

The cancer-associated alleles identified at these four loci (*EF1 α* , *H4*, mtCR, mtCOI) were detected through cloning of PCR products from most of the *M. chilensis* and *M. edulis* individuals that were diagnosed as diseased, but not all (6 of 8, 5 of 8, 7 of 8, and 8 of 9, respectively). For example, the cancer-associated *EF1 α* alleles were not cloned from *M. chilensis* sample Mch23. Quantitative PCR (qPCR) was used to determine whether the diseased animals in these cases, such as Mch23, had the cancer-associated alleles at a level too low to be identified through cloning or whether the transmissible cancer allele was absent from that individual. Primers specific for one of the cancer-associated *EF1 α* alleles (H) were designed, and amplification was compared to amplification from 'universal' *Mytilus EF1 α* primers (**Supplementary file 2**). Analysis of the *M. chilensis* samples showed that the cancer-associated allele was found in all three samples from Ushuaia that were diagnosed as diseased, including Mch23 (**Figure 5**), and it was undetectable in all three normal samples. In the *M. chilensis* from the Pacific Ocean, however, we found that two of the four diseased animals had high levels of the cancer-associated allele, but the other two did not. They likely have either conventional cancer or a different transmissible cancer lineage. Additional samples of all three *Mytilus* species were analyzed by this method. In *M. edulis*, qPCR showed the presence of the cancer-associated allele in all mussels diagnosed as diseased but not in normal samples. To test whether *Mytilus* BTN2 could be present in the Canadian individuals at a low level, qPCR analysis was conducted on the original samples from which *Mytilus* BTN1 was identified (**Metzger et al., 2016**). The allele associated with *Mytilus* BTN2 in *M. edulis* and *M. chilensis* was undetectable in both normal and diseased *M. trossulus* samples from Canada. qPCR primers specific for both cancer-associated *H4* alleles were made, and both were detected in all animals diagnosed as diseased except for the two Chilean samples that were negative for the cancer-associated *EF1 α* allele (**Figure 5**). One allele was present at a higher level within each diseased animal than the other, but the ratio of the two alleles was not completely consistent across all individuals, suggesting that there has been recombination or copy number variation in some subgroups of the cancer lineage. The *H4* cancer-associated alleles were also identified in several normal *M. trossulus*. This confirms that *H4* alleles found in *Mytilus* BTN2 are present in some individuals in the normal *M. trossulus* population. This is expected, as each of the two transmissible cancer lineages arose in the past from a different normal *M. trossulus* individual.

Analysis of the two cancer-associated mitochondrial control region alleles shows that the C allele (only cloned from *M. chilensis* samples) is present in *M. chilensis* cancers at a very low level (<1% of total allele fraction). It was also undetectable in four of eight diseased *M. edulis*, again suggesting that this heteroplasmy may be lost in some of the cancer cells spreading in the *M. edulis* population (**Figure 5**).

Unexpectedly, when comparing the copy number of the D allele to amplification at a conserved locus about 200 bp away (shown schematically in **Figure 3B**), the neoplastic samples yielded values greater than 100%. Further investigation revealed a tandem repeat in the D mitochondrial genome, with multiple copies of the control region that is targeted by allele-specific primers. A tandem repeat was confirmed by generating the reverse complement of the qPCR primers specific for allele D and amplifying and sequencing the tandem repeat junction (marked in **Figure 3B**). While it cannot be directly used to estimate the percent of cancer cells in a sample, this locus is a highly sensitive marker of this lineage.

Analysis of the mtCOI locus by qPCR confirmed that the main *Mytilus* BTN2 allele was identified in all *M. edulis* cancer samples, and in the Argentinian *M. chilensis*, but not the Chilean *M. chilensis*. This suggests that the mitochondria in the Chilean samples (Castro26 and 52) has been completely replaced with one that is a recombinant of the original *Mytilus* BTN2 *M. trossulus*-derived sequence and newly acquired *M. chilensis*-derived sequence.

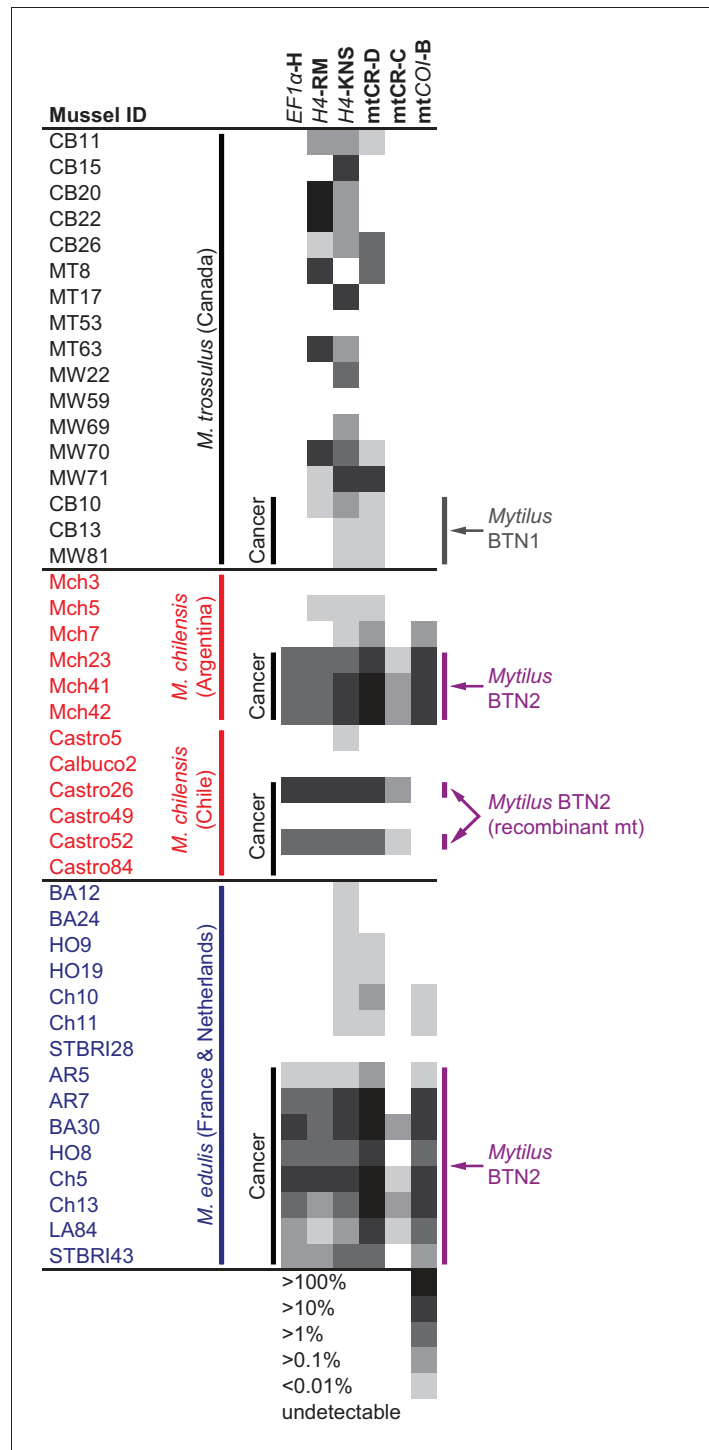


Figure 5. qPCR of multiple loci confirms the presence of the cancer lineage in *M. trossulus* and *M. edulis* from multiple populations. Allele-specific qPCR was conducted to determine the fraction of cancer-associated alleles at the four loci: allele H at *EF1α*, allele RM and KNS at *H4*, allele C and D at *mtCR*, and allele B at *mtCOI* (see **Figure 5—source data 1**). Boxes show whether the cancer-specific allele is undetectable or detectible, with a heatmap showing the fraction of the total alleles at each locus that correspond to the specific allele (the quantity of amplification with an allele-specific qPCR reaction divided by the quantity amplified with ‘universal’ *Mytilus* primers). Each individual mussel is marked with its ID, species, and location, and each animal that was diagnosed as containing disseminated neoplasia is marked ‘Cancer.’
Figure 5 continued on next page

Figure 5 continued

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.010>

The following source data is available for figure 5:

Source data 1. Tab separated text file with qPCR data (U means undetectable).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.011>

Analysis at all loci confirm that two samples from Chile (Castro49 and 84) are not afflicted by *Mytilus* BTN2, while it is present at high levels in the other two diseased samples from Chile and all three tested samples from Argentina and eight from Europe. These two animals without any of the *Mytilus* BTN2 markers at any of the four loci thus do not have the *Mytilus* BTN2 cancer lineage. These data confirm that *Mytilus* BTN2 is distinct from *Mytilus* BTN1, and that it can be detected with multiple methods in both *M. chilensis* and *M. edulis* affected by disseminated neoplasia. Overall, the *EF1 α* qPCR assay is the most highly sensitive and specific assay within these populations, with detection of the cancer-associated allele in all samples known to be affected by *Mytilus* BTN2 and no detectable amplification in any normal samples.

Identification of *M. trossulus*-specific SNPs in *M. chilensis* and *M. edulis* samples

In order to confirm the presence of *M. trossulus*-derived cancer in *M. chilensis* and *M. edulis* individuals we tested for the presence of multiple *M. trossulus*-specific nuclear SNPs in *Mytilus* BTN2-positive specimens from Europe and Argentina, as well as additional samples of healthy mussels from those populations. Following previous studies (Riquet et al., 2017), we analysed SNP markers that are diagnostic between *M. trossulus* and either *M. edulis* or *M. chilensis*. We used 13 SNPs for each species. Five were used for both species, eight were specific to *M. edulis* hosts, and eight were specific to *M. chilensis* (Supplementary file 3). We confirm that all the six *Mytilus* BTN2-positive *M. edulis* and the three positive *M. chilensis* analysed with the SNP assay have strong fluorescence corresponding to the *M. trossulus* allele at all diagnostic loci analysed and they are clear outliers in the compound multi-locus average (Figure 6). In contrast, no normal animals of either species have a signal of an *M. trossulus* allele at more than one locus. Therefore, data from multiple independent loci provide further evidence supporting the finding that the *Mytilus* BTN2 lineage is an *M. trossulus* derived cancer.

Discussion

Disseminated neoplasia has been previously shown to be due to a transmissible cancer lineage in four bivalve species, including *Mytilus trossulus* (Metzger et al., 2016; Metzger et al., 2015), and the current study greatly extends both our understanding of cross-species transmission of cancer (from *M. trossulus* into two other *Mytilus* species) and our understanding of the potential for geographic spread of transmissible cancers (Figure 7). This finding of a single lineage crossing into multiple species across such vast distances is unexpected. Phylogenetic evidence from four loci and SNP data from 13 diagnostic nuclear SNPs show that the lineage identified here (*Mytilus* BTN2) is distinct from *Mytilus* BTN1, and that it too arose from a *M. trossulus* individual before crossing into other *Mytilus* species, as previously proposed (Riquet et al., 2017). The gene trees of the four loci are all concordant with each other, and are all consistent with a clonal, asexual cancer lineage derived from an *M. trossulus* cancer that is independent from *Mytilus* BTN1. The only exception to this is the observation of recombination with host mitochondrial DNA in the mitogenomes of *Mytilus* BTN2 in Chile. The age of this cancer lineage is unknown, but the other transmissible cancer with world-wide spread (canine transmissible venereal tumor; CTVT) was estimated to be thousands of years old (Murchison et al., 2014; Baez-Ortega et al., 2019). Our oldest samples are 10 years old, but if the earliest reports of disseminated neoplasia in *M. edulis* were attributable to this same lineage (Farley, 1969), it would be at least 50 years old.

The transmission of cancer cells from the Northern to the Southern Hemisphere and from Atlantic to Pacific Oceans is remarkable, and ocean currents are unlikely to provide a mechanism for travel in either direction (especially given that anti-tropical distribution prevents a stepping-stone for trans-

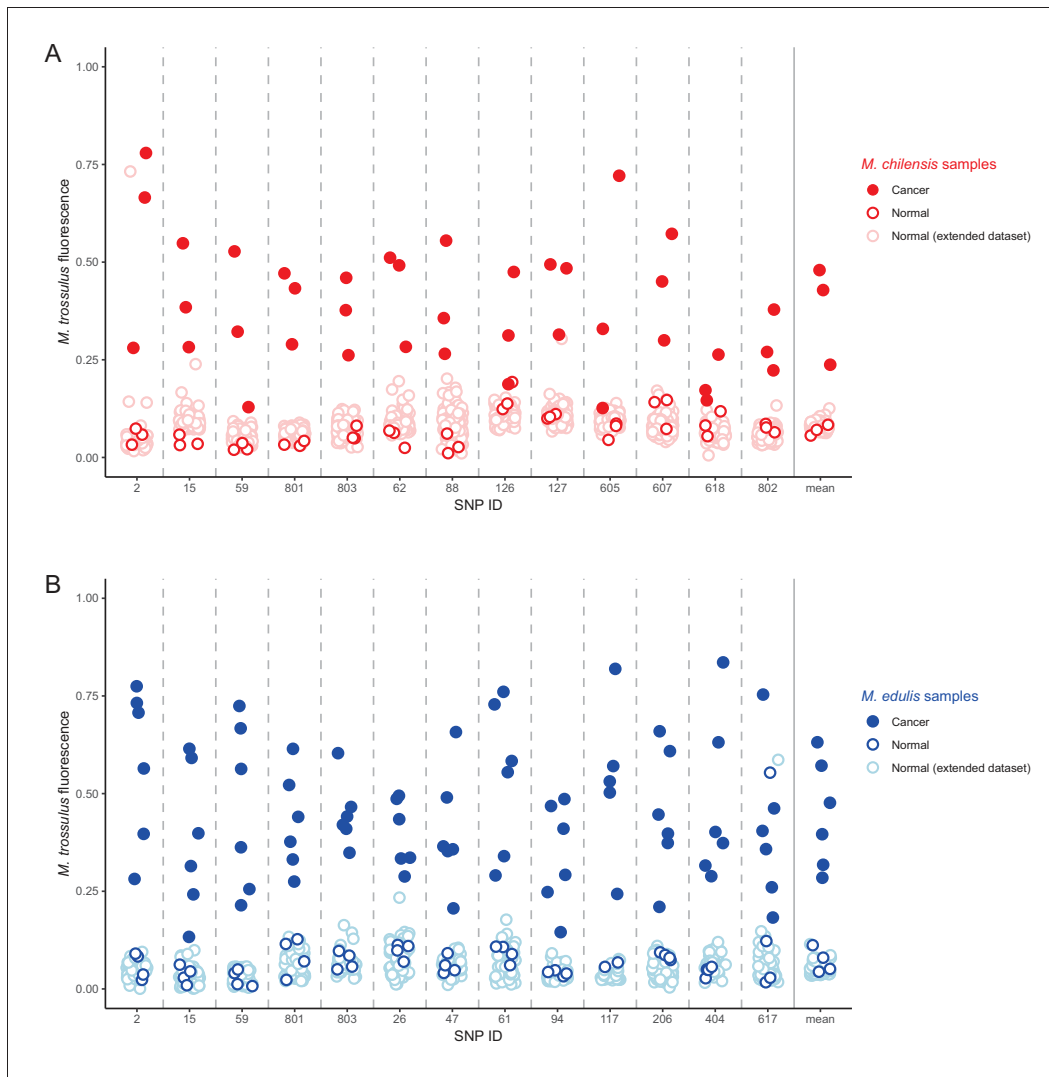


Figure 6. Identification of *M. trossulus*-specific SNPs in *M. chilensis* and *M. edulis* samples. Cancer and normal samples of (A) *M. chilensis* from Argentina and (B) *M. edulis* from Europe were analyzed for the presence of 13 SNPs that are diagnostic for *M. trossulus* alleles. The fraction of the fluorescence attributable to the *M. trossulus* allele is shown for each SNP, and the mean multi-locus estimate is shown on the right. SNP IDs indicate shortened names of the specific nuclear SNP loci used (see **Supplementary file 3**). Red points indicate *M. chilensis* and blue indicate *M. edulis*. Dark filled circles represent cancer samples, dark open circles represent normal samples which were a part of the sequence and qPCR analysis (**Figures 1–4**), and light open circles represent samples from an extended set of normal individuals from the same populations. Cancer samples included: Mch23, Mch41, and Mch42 for *M. chilensis*, and BA30, HO8, Ch5, Ch13, LA84, and STRBI43 from *M. edulis*. Normal samples included Mch3, Mch5, and Mch7 for *M. chilensis*, and HO9, HO19, Ch10, and Ch11 for *M. edulis*, as well as 109 additional normal *M. chilensis* and 62 additional normal *M. edulis*. See **Figure 6—source data 1** for *M. chilensis* data and **Figure 6—source data 2** for *M. edulis* data.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.012>

The following source data is available for figure 6:

Source data 1. Comma separated text file with SNP data from *M. chilensis* samples.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.013>

Source data 2. Comma separated text file with SNP data from *M. edulis* samples.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.014>

equatorial propagation). The most likely route of transmission is human intervention, specifically the transportation of animals harboring neoplastic cells in or on shipping vessels. While it is difficult to experimentally prove that a particular disease transmission was due to accidental transport on shipping vessels, examples of anthropogenic introduction of invasive species via shipping transport and

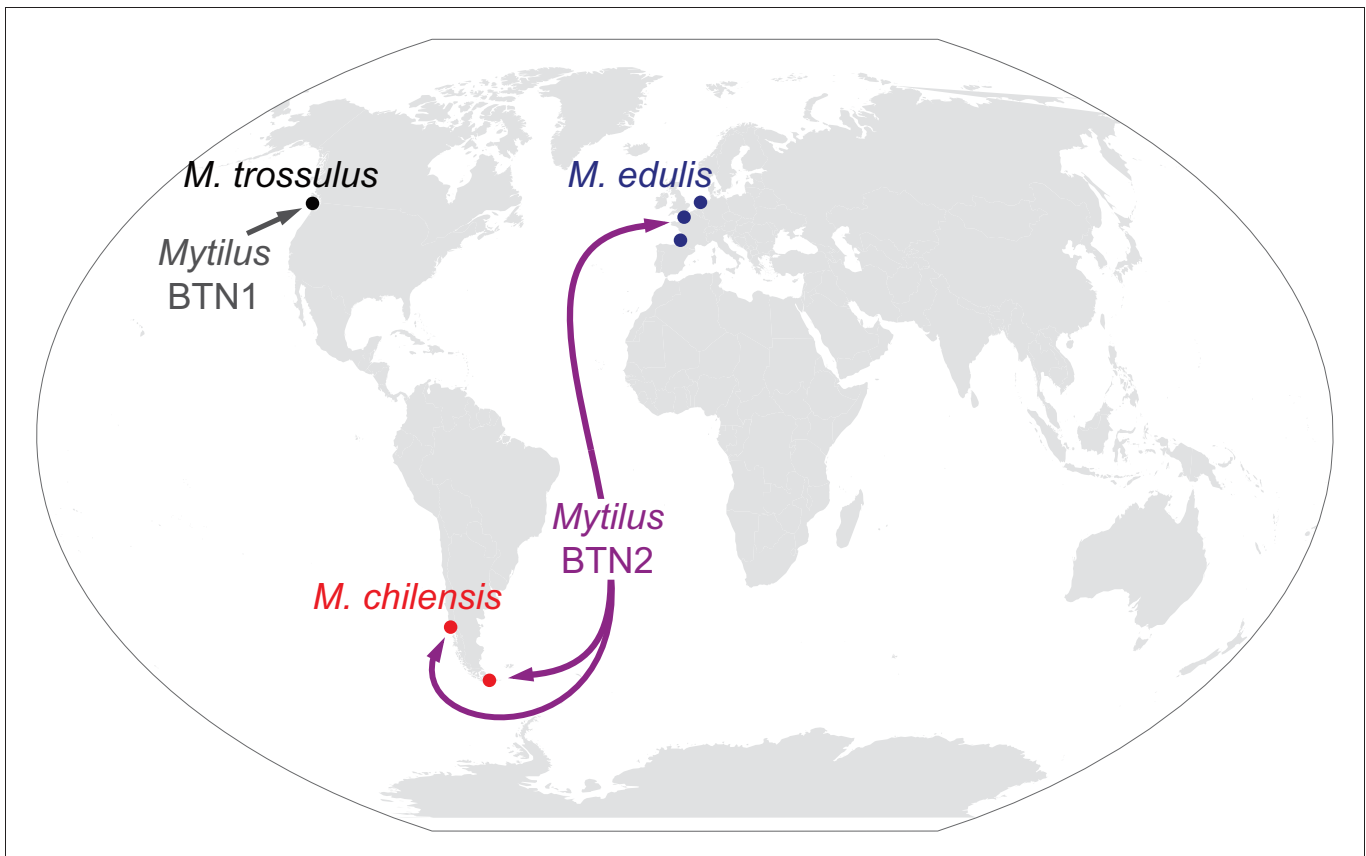


Figure 7. Map of the spread of *Mytilus* BTN1 and 2. The locations of all collections in the current study are shown with circles. Diseased animals were found at all collection locations. The species collected at each location is marked. The *Mytilus* BTN1 lineage (gray) was only identified in *M. trossulus* populations in BC, Canada, while the *Mytilus* BTN2 lineage (purple) was identified in both *M. edulis* and *M. chilensis* populations in both the Pacific and Atlantic Oceans. Both cancer lineages originated in an *M. trossulus* individual, although the exact locations of the origins are unknown. The direction of spread of these cancers is unknown. Winkel-Tripel map was created by Flappiefh (Wikimedia Commons) using gringer's perlshaper script, and Natural Earth (naturalearthdata.com).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.015>

aquaculture are common throughout the globe (Molnar et al., 2008). The accidental anthropogenic introduction of *Mytilus* species includes *M. galloprovincialis* introduced in northern Chile (Daguin and Borsa, 2000) and Argentina (Zbawicka et al., 2018), *M. edulis* introduced in BC (Crego-Prieto et al., 2015) and the Kerguelen islands (Fraisse et al., 2018), and *M. trossulus* into Scotland (Dias et al., 2009). Since *Mytilus* species are known to adhere to ships and spread accidentally across the world, and transmissible cancer can have an incubation period of weeks to months, any diseased animal which adheres to a ship could lead to the spread of a transmissible cancer to new and potentially susceptible populations. If transmissible cancers are able to readily travel along shipping lines and infect closely related species, then this and other lineages of transmissible cancer have the potential for world-wide reach.

When identifying identical or nearly identical sequences in samples from different locations, care must be taken to prevent a small amount of contamination from leading to a false positive. In this case, the initial sequencing and amplification of the *EF1 α* loci from *M. edulis* and *M. chilensis* samples were conducted by different people at different sites before any plasmids containing the sequence from one site had been transferred to the other. The *EF1 α* qPCR assay was independently replicated on European *M. edulis* infected individuals in two labs, in USA and France. Also, the finding of slight differences between the two subgroups of this cancer lineage argue against a single source of contamination. Additionally, qPCR verification confirms that a significant fraction of the DNA of each sample contains the cancer-associated allele, and that it is not found in DNA samples

from normal animals, which have been treated in the same way. Therefore, the data could not be due to contamination with a small amount of DNA and represents genuine identification of a nearly identical cancer from mussels of different continents and species.

Invertebrates do not possess a vertebrate-like adaptive immune system or a major histocompatibility complex, which vertebrates utilize for discriminating self from nonself. However, in most previously identified cases of BTN, the neoplasia has only been identified in the species of origin (**Metzger et al., 2016; Metzger et al., 2015**), and attempts to experimentally transfer neoplastic cells from *M. trossulus* or the soft-shell clam *Mya arenaria* into several bivalve species have only been successful when the transfer is between members of the same species (**Kent et al., 1991; Mateo et al., 2016**). The species in the *Mytilus* complex are able to hybridize, so the barrier to cross-species transmission may be relatively low. However, it has been reported that the disseminated neoplasia found on the Pacific coast of North America (which was identified as originating from *M. trossulus*) was found in *M. trossulus* at a much higher prevalence than *M. edulis* in the same region (**Muttray et al., 2007**), which suggested that the *M. trossulus* cancer preferentially infected *M. trossulus* hosts. It is currently unknown whether *Mytilus* BTN2 would be able to infect its original host species or if the original host has evolved resistance, as was suggested with the cancer derived from the pullet shell clam *Venerupis corrugata* (**Metzger et al., 2016**). *M. chilensis* is closely related to *M. edulis*, and it has even been suggested that it could be considered a subspecies, *M. edulis platensis* (**Borsa et al., 2012**), although this is controversial (**Zbawicka et al., 2018**), so once the cancer was able to cross into either *M. chilensis* or *M. edulis*, the second jump into the other species may have presented a lower barrier. Based on analysis of transmissible cancers in devils and dogs it has been hypothesized that transmissible cancers primarily occur in inbred populations, but the finding of this cancer spreading into highly outbred individuals from multiple different species within the same genus shows that this constraint is not universal.

The evidence for mitochondrial heteroplasmy and recombination observed in this cancer lineage and its loss or gain is a very interesting observation that suggests a dynamic mitochondrial population in BTN, which may not exactly match the nuclear evolutionary path. It has been shown that mitochondria in CTVT has been replaced several times by mitochondrial capture of new normal mitochondrial genomes (**Rebeck et al., 2011; Strakova et al., 2016**), so a dynamic mitochondrial population may be a common feature among transmissible cancers. It is also possible that one of the two cancer-associated mtCR regions could be a nuclear-to-mitochondrial transfer (numt) of a copy of the control region instead of mitochondrial heteroplasmy, as this possibility cannot be excluded by PCR of total extracted DNA. If this were the case, the sequences would still be evidence of an *M. trossulus*-derived transmissible cancer that is distinct from *Mytilus* BTN1. Mitochondrial replacement has not yet been described in any BTN, so further analysis will be required to determine the full recombinant cancer mitogenomes and to test whether there is any selective advantage of this recombinant mitogenome in *Mytilus* BTN2.

Comparison of cancer-associated sequences to those found in normal *M. trossulus* populations may allow us to identify the location of the origin of these cancer lineages. BLAST searches for the neoplasia-associated alleles most closely match *M. trossulus* from the Baltic and BC. The *Mytilus* BTN2 recombinant mitochondrial sequences closely match the recombinant sequence first identified in the Baltic (62mc10), but this haplotype is actually rare in the Baltic, with similar recombinant haplotypes more commonly found on the coast of Norway (**Śmietanka and Burzyński, 2017**). This suggests that this cancer lineage originated in Northern Europe, but it may not necessarily be from the Baltic. However, there are populations of *M. trossulus* in many locations around the world, and not all have been sequenced at the loci analyzed here. Additionally, the mtCR C and D alleles may be directly related to 62mc10, or they may represent novel recombinations in the same region (there is a single base difference in the recombination region between the D allele and 62mc10 which suggests that the recombination points are not identical). Multiple recombination events in which male sequence has recombined into the female mitochondrial lineage in that region (including several cases with tandem duplications) have been identified in *M. trossulus* (**Burzyński et al., 2006**). Additionally, while exact matches of a *Mytilus* BTN2 H4 allele was identified in *M. trossulus* from BC, exact matches of the alleles at other loci have not been identified in any wild *M. trossulus* populations. Therefore, the exact population of origin of this cancer remains uncertain.

Overall, these data show that two lineages of cancer from two separate *M. trossulus* individuals have turned into BTN lineages, and one of these lineages (*Mytilus* BTN2) has spread world-wide

throughout multiple host species. This spread also suggests that anthropogenic influence may exacerbate the spread of cancers and may allow access into new environments and new populations, where the pathogenic potential is unknown.

Materials and methods

***M. chilensis* collection and diagnosis**

60 individual market-sized mussels (mean, 67.6 mm; range, 52–92 mm in the longest axis) were collected in February 2012 from a culture at Bahía Brown (54°52'S, 67°31'W), Beagle Channel, Argentina. The soft parts of the specimens were carefully removed from their shells and fixed in Davidson's solution for 24 hr. Oblique transverse sections, approximately 5 mm thick, including mantle, gills, gonad, digestive gland, nephridia, and foot were taken from each specimen. Tissue samples were embedded in paraffin, and 5 µm sections were stained with hematoxylin and eosin. Histological sections were examined using a Leica DM 2500 light microscope for the presence of neoplastic cells. Small samples of gill from each mussel were preserved in 100% ethanol for DNA extraction.

200 individuals were collected from a farmed population at two sites in Chile (Calbuco and Castro). Hemolymph was drawn from adductor muscle, centrifuged at low speed and the hemocytes were stored in RNAlater (ThermoFisher Scientific) for DNA extraction. The animals were opened and the full body with one valve were fixed for at least one week with 10% formaldehyde in PBS. Tissue samples were embedded in paraffin, sectioned and stained as above. The animals were diagnosed as diseased if infiltration of hemocytes with a high nucleus-cytoplasm ratio and granular chromatin were observed.

Healthy mussels from other populations of *M. chilensis* around Punta Arenas, Chile (n = 46) and from islands around Parque Nacional Alberto de Agostini, Chile (n = 63) were analyzed with the SNP assay.

***M. edulis* collection and diagnosis**

We used a collection of samples (gills in 90% ethanol) accumulated by the ISEM lab for years in their study of hybridization and introgression in the *M. edulis* complex of species. *M. trossulus* is not naturally found in France and the genetic analysis of thousands of individuals did not identify any *M. trossulus* individuals even in ports or mussel farms (Simon et al., 2019). As a consequence, a signal of amplification of trossulus alleles at several diagnostic SNPs was used as a diagnosis for mussels likely infected by a *M. trossulus* BTN (Riquet et al., 2017). Here we first used specimens identified by Riquet et al.: two mussels sampled in the Arcachon Bay (South-West of France) in 2016 (AR5 and AR7), one mussel sampled in Barfleur (Normandy, France) in 2015 (BA30), and one mussel sampled in the Wadden Sea (The Netherlands) in 2009 (HO8). To these four mussels already described, we added two additional mussels identified in a new extensive genetic survey of >4000 individuals (Simon et al., 2019). These two mussels were collected from Chausey Island (English Channel) in 2009 (Ch5 and Ch13). For comparison, two healthy individuals were randomly chosen from each of the collections from Chausey, Barfleur, and the Wadden Sea (Ch10, Ch11, BA12, BA24, HO9, HO19). Additional healthy mussels from the populations of Chausey (n = 9), Barfleur (n = 28) and Wadden Sea (n = 21) were analyzed with the SNP assay.

In parallel, a hemocytological analysis was undertaken to identify BTN infected mussels on approximately one hundred individuals from Brittany. Briefly, the mussels were anaesthetized by bathing them for 30 min in a solution containing 50 g/L of magnesium chloride dissolved in two-thirds of distilled water and one-third of sea water (Suquet et al., 2009). 40 µl of hemolymph were withdrawn from the adductor muscle with a sterile 1 mL syringe fitted with a 27-gauge needle. After the addition of 160 µl of artificial seawater, the hemolymph solution was 'cytospun' onto coated slides (Shandon Cytospin four and Cytoslides, Thermo Scientific; 10 min, 800 rpm), fixed, stained with May-Grünwald Giemsa, and observed under light microscopy. The whole area of the cell spot on the cytospin slide was observed in all the samples in search of neoplastic cells, characterized by an enlarged diameter, elevated nucleus-cytoplasm ratio, and high basophilia. Two individuals that also showed a signal of *M. trossulus* allele amplification from gill tissue DNA were chosen for the present study. One was sampled in Lannion (LA84) and the other in Saint Brieux (STBRI43) in 2017. An

additional normal individual from Saint Brieux (STBRI28) was also analyzed as a control, and additional healthy individuals from Lannion ($n = 4$) were analyzed with the SNP assay.

DNA extraction

DNA was extracted from ethanol-fixed gill and siphon samples using DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) with the following additional steps to remove PCR-inhibiting polysaccharides. After tissue lysis, 65 μ l of P3 Buffer (Qiagen) was added for 5 min to precipitate out polysaccharides and spun down at $17k \times g$ at 4°C for 5 min. The resulting supernatant was transferred to a new tube, 200 μ l of Buffer AL was added, and the manufacturer's protocol resumed. DNA was extracted from hemocyte samples using the standard DNeasy Blood and Tissue Kit protocol.

PCR and cloning

Primers and annealing temperatures are listed in **Supplementary file 1**. PCR amplification at the *EF1 α* locus was done using PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent) with a 15 s extension time. Amplification at the *H4*, mtCR, and mtCOI loci were achieved using Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) with a 30 s extension time. Primers for *H4* were designed to span the full *H4* gene (Eirín-López *et al.*, 2004). Primers for mtCR were adapted from Burzynski *et al.* and were designed to cover lrRNA, a variable domain, and a conserved domain in the mitochondrial DNA control region (Burzyński *et al.*, 2006). 'Pan-molluscan' barcoding primers (Folmer *et al.*, 1994) did not amplify the *Mytilus* BTN2 mtCOI allele, so degenerate primers flanking the standard mtCOI were used. In all cases, 25–50 ng of genomic DNA was amplified for 35 cycles.

PCR products were gel extracted using spin columns (Qiagen, NEB) and either directly sequenced, or, when multiple alleles at a locus could not be resolved by direct sequencing, were cloned using the Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen). Plasmids were transformed into TOP10 or DH5 α competent *E. coli* (Invitrogen) and 6–12 clones were picked for further sequencing using M13F and M13R primers (Genewiz). The primer binding regions were excluded from sequence analysis, and all unique alleles were identified. In cases where a sequence was found in only a single clone and that clone differed by <0.5% (two differences for *EF1 α* and *H4*, three for mtCR) from another allele that was supported by more than one clone from the same individual, the sequence with higher support was used as the correct allele. Additionally, a sequence which was found in only one clone and which is consistent with a recombination event between two alleles from the same sample was discarded. For *EF1 α* , every allele presented was found in at least two clones (two sequences found only in single clones were removed from analysis). Alleles were named arbitrarily, such that each allele name (A-2H) represents the same sequence at that locus.

Phylogenetic analysis

Coding sequences had minimal indels and were aligned manually. The mtCR locus was aligned with MUSCLE 3.8.31 (Edgar, 2004) with minor manual adjustment. Maximum likelihood phylogenetic trees were generated using PhyML 3.0 (49), with 100 bootstrap replicates, which treats gaps in the alignment as missing data, with automatic model selection through Akaike Information Criterion. Trees were visualized using FigTree version 1.4.4. All alignments are included as source data, and all sequences will be available in GenBank.

qPCR

Cancer-associated allele-specific qPCR was performed in *M. trossulus*, *M. edulis*, and *M. chilensis* genomic DNA samples using PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). For all targets, one primer set was designed to specifically amplify a cancer-associated allele for a given locus (*EF1 α* : Allele H; *H4*: Allele RM and KNS; mtCR: Allele C and D; mtCOI: Allele B). A second pair of universal control primers were designed to amplify all *Mytilus* alleles at each locus. Primers are listed in **Supplementary file 2**. Standards for all targets consisted of a single plasmid containing the relevant cancer-associated allele target, which was linearized by NotI-HF (NEB) restriction digest before qPCR. Serial dilutions (10^7 – 10^1 copies) of linearized standard plasmid in triplicate were used to generate a standard curve for each qPCR run. In all experimental cases, 10–100 ng of each genomic DNA sample was run in triplicate 10 μ l reactions.

All qPCR assays were performed using the Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) and associated software. Allele-specific qPCR at the *EF1 α* locus was comprised of a 3-step cycling stage (95°C for 15 s, 50°C for 15 s, and 60°C for 30 s, respectively) for 40 cycles, whereas qPCR at the *H4*, *mtCR*, and *mtCOI* loci were run using a 2-step cycling stage protocol (95°C for 15 s, 60°C for 30 s) for 40 cycles. A melting curve was generated to determine amplification specificity according to the following parameters: an initial denaturation step at 95°C for 15 s, followed by a gradual temperature increase from 60°C to 95°C (Ramp of +0.3°C). The ratio of the cancer-associated allele to all alleles present at a given locus was calculated for each sample using the average copy number amplified by cancer-associated primers in triplicate reactions divided by the average copy number amplified by the universal primers in triplicate reactions. For each sample, the limit of detection for the allele-specific qPCR was set at 10 copies/reaction, and DNA samples were discarded if the universal *Mytilus* reaction at any of the loci yielded <5000 copies/reaction (upper limit of detection of 0.2%).

SNP array

The SNPs used were previously described (Simon *et al.*, 2018). They were identified as being diagnostic (nearly fixed for alternative alleles) in a large sequence dataset (Fraïsse *et al.*, 2016) and were subsequently verified to remain diagnostic with larger sample sizes (Simon *et al.*, 2019). Non-hybrid individuals can nonetheless occasionally be heterozygous at one, or very rarely at two, of these diagnostic loci because incomplete lineage sorting and introgression is pervasive in the *M. edulis* complex of species (Fraïsse *et al.*, 2018), but never at more than two loci. Genotyping was subcontracted to LGC-genomics and performed with the Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) chemistry (Semagn *et al.*, 2014). The results are a combination of two fluorescence values, one for allele 1 (x), and another for allele 2 (y), the *M. trossulus*-specific allele. Following a method used for genotyping polyploids (Cuenca *et al.*, 2013), we transformed the data to have a single measure of the relative fluorescence of the two alleles, from 0 when the fluorescence of allele one dominates, to one when the fluorescence of allele 2 (*i.e.* the *M. trossulus* allele) dominates, using the following formula: $y' = y/(x+y)$. The fluorescence of the *M. trossulus* alleles was averaged over all 13 diagnostic loci for each species to obtain a compound multi-locus estimate (see **Supplementary file 3**).

Acknowledgements

The authors express their gratitude to Lic. Andrés Fernández from Secretaría de Desarrollo Sustentable y Ambiente de Tierra del Fuego province for sampling activities. We thank J Ausiό for help in collection of *M. trossulus* from Vancouver Island, Canada, and Jorge Gomez for help in the collection of *M. chilensis* from Calbuco and Castro, Chile.

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
National Institutes of Health	K22 CA226047	Michael J Metzger
Howard Hughes Medical Institute	Goff Lab	Stephen P Goff
Howard Hughes Medical Institute	EXROP	Maria Polo-Prieto
Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico	FONDECYT1180705	Gloria Arriagada
Montpellier Université d'Excellence	BLUECANCER	Maurine Hammel Alexis Simon Nicolas Bierne
Agence Nationale de la Recherche	ANR-18-CE35-0009	Maurine Hammel Alexis Simon Nicolas Bierne

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas 2014-0670

Nuria Vázquez

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Marisa A Yonemitsu, Data curation, Investigation, Writing—review and editing; Rachael M Giersch, Maria Polo-Prieto, Alexis Simon, Florencia Cremonete, Fernando T Avilés, Nicolás Merino-Véliz, Investigation, Writing—review and editing; Maurine Hammel, Erika AV Burioli, Resources, Supervision, Investigation, Writing—review and editing; Annette F Muttray, James Sherry, Carol Reinisch, Susan A Baldwin, Resources, Writing—review and editing; Stephen P Goff, Conceptualization, Resources, Supervision, Project administration, Writing—review and editing; Maryline Houssin, Gloria Arriagada, Supervision, Investigation, Writing—review and editing; Nuria Vázquez, Nicolas Bierne, Conceptualization, Supervision, Investigation, Writing—review and editing; Michael J Metzger, Conceptualization, Data curation, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Writing—original draft, Project administration, Writing—review and editing

Author ORCIDs

Alexis Simon <http://orcid.org/0000-0002-6176-5045>

Stephen P Goff <http://orcid.org/0000-0002-9679-0582>

Michael J Metzger <https://orcid.org/0000-0001-7855-1388>

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.022>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.023>

Additional files

Supplementary files

- Supplementary file 1. Table of PCR primers used for amplification and sequencing.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.016>

- Supplementary file 2. Table of qPCR primers used.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.017>

- Supplementary file 3. Table of diagnostic SNP loci used to discriminate *M. trossulus* from *M. edulis* and *M. chilensis*.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.018>

- Transparent reporting form DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47788.019>

Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in the manuscript and supporting files. Source data files have been provided for Figures 1-5 and S1. Sequences will be available in genbank.

References

Baez-Ortega A, Gori K, Strakova A, Allen JL, Allum KM, Bansse-Issa L, Bhutia TN, Bisson JL, Briceño C, Castillo Domracheva A, Corrigan AM, Cran HR, Crawford JT, Davis E, de Castro KF, B de Nardi A, de Vos AP, Delgadillo Keenan L, Donelan EM, Espinoza Huerta AR, et al. 2019. Somatic evolution and global expansion of an ancient transmissible Cancer lineage. *Science* **365**:eaau9923. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aau9923>, PMID: 31371581

Barber BJ. 2004. Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. *Aquatic Living Resources* **17**: 449–466. DOI: <https://doi.org/10.1051/alr:2004052>

- Benabdelmouna A**, Ledu C. 2016. The mass mortality of blue mussels (*Mytilus* spp.) from the Atlantic coast of France is associated with heavy genomic abnormalities as evidenced by flow cytometry. *Journal of Invertebrate Pathology* **138**:30–38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.06.001>, PMID: 27264803
- Benabdelmouna A**, Saunier A, Ledu C, Travers MA, Morga B. 2018. Genomic abnormalities affecting mussels (*Mytilus edulis-galloprovincialis*) in France are related to ongoing neoplastic processes, evidenced by dual flow cytometry and cell monolayer analyses. *Journal of Invertebrate Pathology* **157**:45–52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.08.003>, PMID: 30099011
- Bierne N**, Borsa P, Daguin C, Jollivet D, Viard F, Bonhomme F, David P. 2003. Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Molecular Ecology* **12**:447–461. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01730.x>, PMID: 12535095
- Borsa P**, Rolland V, Daguin-Thiébaud C. 2012. Genetics and taxonomy of Chilean smooth-shelled mussels, *Mytilus* spp. (Bivalvia: mytilidae). *Comptes Rendus Biologies* **335**:51–61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.10.002>, PMID: 22226163
- Bower SM**, McGladdery SE, Price IM. 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases* **4**:1–199. DOI: [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(94\)90028-0](https://doi.org/10.1016/0959-8030(94)90028-0)
- Burzyński A**, Zbawicka M, Skibinski DO, Wenne R. 2006. Doubly uniparental inheritance is associated with high polymorphism for rearranged and recombinant control region haplotypes in Baltic *Mytilus trossulus*. *Genetics* **174**:1081–1094. DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.106.063180>, PMID: 16951056
- Campalans M**, Gonzalez M, Rojas P. 1998. Neoplasia in *Mytilus chilensis* cultivated in Chiloe island (Chile). *B Eur Assoc Fish Pat* **18**:93–95.
- Carballal MJ**, Barber BJ, Iglesias D, Villalba A. 2015. Neoplastic diseases of marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology* **131**:83–106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.004>, PMID: 26146225
- Carella F**, Figueras A, Novoa B, De Vico G. 2013. Cytomorphology and PCNA expression pattern in bivalves *Mytilus galloprovincialis* and *Cerastoderma edule* with haemic neoplasia. *Diseases of Aquatic Organisms* **105**:81–87. DOI: <https://doi.org/10.3354/dao02612>, PMID: 23836773
- Ciocan C**, Sunila I. 2005. Disseminated neoplasia in blue mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from the black sea, Romania. *Marine Pollution Bulletin* **50**:1335–1339. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.04.042>, PMID: 15946706
- Crego-Prieto V**, Ardura A, Juanes F, Roca A, Taylor JS, Garcia-Vazquez E. 2015. Aquaculture and the spread of introduced mussel genes in British Columbia. *Biological Invasions* **17**:2011–2026. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10530-015-0853-z>
- Cremonte F**, Vázquez N, Silva MR. 2011. Gonad Atrophy Caused by Disseminated Neoplasia in *Mytilus chilensis* Cultured in the Beagle Channel, Tierra Del Fuego Province, Argentina. *Journal of Shellfish Research* **30**:845–849. DOI: <https://doi.org/10.2983/035.030.0325>
- Cremonte F**, Puebla C, Tillería J, Videla V. 2015. Histopathological survey of the mussel *Mytilus chilensis* (Mytilidae) and the clam *Gari solida* (Psammobiidae) from southern Chile/Estudio histopatológico del chorito *Mytilus chilensis* (Mytilidae) y del culengue *Gari solida* (Psammobiidae) en el sur de Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research* **43**:248–254. DOI: <https://doi.org/10.3856/vol43-issue1-fulltext-21>
- Cuenca J**, Aleza P, Navarro L, Ollitrault P. 2013. Assignment of SNP allelic configuration in polyploids using competitive allele-specific PCR: application to Citrus triploid progeny. *Annals of Botany* **111**:731–742. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mct032>, PMID: 23422023
- Daguin C**, Borsa P. 2000. Genetic relationships of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck populations worldwide: evidence from nuclear-DNA markers. *Geological Society, London, Special Publications* **177**:389–397. DOI: <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2000.177.01.26>
- Dias PJ**, Dordor A, Tulett D, Piertney S, Davies IM, Snow M. 2009. Survey of mussel (*Mytilus*) species at Scottish shellfish farms. *Aquaculture Research* **40**:1715–1722. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02274.x>
- Edgar RC**. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**:1792–1797. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Eirín-López JM**, Fernanda Ruiz M, González-Tizón AM, Martínez A, Sánchez L, Méndez J. 2004. Molecular evolutionary characterization of the mussel *Mytilus* histone multigene family: first record of a tandemly repeated unit of five histone genes containing an H1 subtype with "orphan" features. *Journal of Molecular Evolution* **58**:131–144. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00239-003-2531-5>, PMID: 15042333
- Farley CA**. 1969. Sarcomatoid proliferative disease in a wild population of blue mussels (*Mytilus edulis*). *Journal of the National Cancer Institute* **43**:509–516. PMID: 5797841
- Folmer O**, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**:294–299. PMID: 7881515
- Fraïsse C**, Belkhir K, Welch JJ, Bierne N. 2016. Local interspecies introgression is the main cause of extreme levels of intraspecific differentiation in mussels. *Molecular Ecology* **25**:269–286. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.13299>
- Fraïsse C**, Haguénauer A, Gerard K, Weber AA-T, Bierne N, Chenuil A. 2018. Fine-grained habitat-associated genetic connectivity in an admixed population of mussels in the small isolated Kerguelen islands. *bioRxiv*. DOI: <https://doi.org/10.1101/239244>
- Fraïsse C**, Roux C, Gagnaire P-A, Romiguier J, Favre N, Welch JJ, Bierne N. 2018. The divergence history of European blue mussel species reconstructed from approximate Bayesian computation: the effects of sequencing techniques and sampling strategies. *PeerJ* **6**:e5198. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.5198>

- Gombač M**, Sitar R, Pogačnik M, Arzul I, Jenčič V. 2013. Haemocytic neoplasia in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Slovene Adriatic Sea. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* **46**: 135–143. DOI: <https://doi.org/10.1080/10236244.2013.782736>
- Green M**, Alderman DJ. 1983. Neoplasia in *Mytilus edulis* L. from united kingdom waters. *Aquaculture* **30**:1–10. DOI: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90146-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90146-1)
- Guindon S**, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**: 307–321. DOI: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>, PMID: 20525638
- Kent ML**, Wilkinson MT, Drum AS, Elston RA. 1991. Failure of transmission of hemic neoplasia of bay mussels, *Mytilus trossulus*, to other bivalve species. *Journal of Invertebrate Pathology* **57**:435–436. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90148-J](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90148-J), PMID: 2066579
- Lohrmann KB**, Bustos E, Rojas R, Navarrete F, Robotham H, Bignell J. 2019. Histopathological assessment of the health status of *Mytilus chilensis* (Hupé 1854) in southern Chile. *Aquaculture* **503**:40–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.080>
- Lowe DM**, Moore MN. 1978. Cytology and quantitative cytochemistry of a proliferative atypical hemocytic condition in *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mollusca) 2 3. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **60**:1455–1459. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/60.6.1455>
- Mateo DR**, MacCallum GS, Davidson J. 2016. Field and laboratory transmission studies of haemic neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*, from Atlantic Canada. *Journal of Fish Diseases* **39**:913–927. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfd.12426>, PMID: 26687447
- Metzger MJ**, Reinisch C, Sherry J, Goff SP. 2015. Horizontal transmission of clonal Cancer cells causes leukemia in soft-shell clams. *Cell* **161**:255–263. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.042>, PMID: 25860608
- Metzger MJ**, Villalba A, Carballal MJ, Iglesias D, Sherry J, Reinisch C, Muttaray AF, Baldwin SA, Goff SP. 2016. Widespread transmission of independent Cancer lineages within multiple bivalve species. *Nature* **534**:705–709. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature18599>, PMID: 27338791
- Metzger MJ**, Goff SP. 2016. A sixth modality of infectious disease: contagious Cancer from devils to clams and beyond. *PLOS Pathogens* **12**:e1005904. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005904>, PMID: 27788268
- Molnar JL**, Gamboa RL, Revenga C, Spalding MD. 2008. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Frontiers in Ecology and the Environment* **6**:485–492. DOI: <https://doi.org/10.1890/070064>
- Murchison EP**, Wedge DC, Alexandrov LB, Fu B, Martincorena I, Ning Z, Tubio JMC, Werner EI, Allen J, De Nardi AB, Donelan EM, Marino G, Fassati A, Campbell PJ, Yang F, Burt A, Weiss RA, Stratton MR. 2014. Transmissible [corrected] dog Cancer genome reveals the origin and history of an ancient cell lineage. *Science* **343**:437–440. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1247167>, PMID: 24458646
- Murgia C**, Pritchard JK, Kim SY, Fassati A, Weiss RA. 2006. Clonal origin and evolution of a transmissible Cancer. *Cell* **126**:477–487. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.051>, PMID: 16901782
- Muttaray AF**, St-Jean S, Bishay F, van Poppel P, Baldwin SA. 2007. Comparison of Tumor-Suppressor gene expression in two mussel species with different susceptibilities to Haemic Neoplasia, a Cancer of the haemolymph. 36th Aquatic Toxicity Workshop September 27–30th, La Malbaie, Charlevoix.
- Pearse AM**, Swift K. 2006. Allograft theory: transmission of Devil facial-tumour disease. *Nature* **439**:549. DOI: <https://doi.org/10.1038/439549a>, PMID: 16452970
- Pye RJ**, Pemberton D, Tovar C, Tubio JM, Dun KA, Fox S, Darby J, Hayes D, Knowles GW, Kreiss A, Siddle HV, Swift K, Lyons AB, Murchison EP, Woods GM. 2016. A second transmissible Cancer in tasmanian devils. *PNAS* **113**:374–379. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1519691113>, PMID: 26711993
- Rasmussen LPD**. 1986. Occurrence, prevalence and seasonality of neoplasia in the marine mussel *Mytilus edulis* from three sites in Denmark. *Marine Biology* **92**:59–64. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00392746>
- Rebbeck CA**, Thomas R, Breen M, Leroi AM, Burt A. 2009. Origins and evolution of a transmissible Cancer. *Evolution* **63**:2340–2349. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00724.x>
- Rebbeck CA**, Leroi AM, Burt A. 2011. Mitochondrial capture by a transmissible Cancer. *Science* **331**:303. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1197696>, PMID: 21252340
- Riquet F**, Simon A, Bierne N. 2017. Weird genotypes? Don't discard them, transmissible Cancer could be an explanation. *Evolutionary Applications* **10**:140–145. DOI: <https://doi.org/10.1111/eva.12439>, PMID: 28127390
- Semagn K**, Babu R, Hearne S, Olsen M. 2014. Single nucleotide polymorphism genotyping using kompetitive allele specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding* **33**:1–14. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9917-x>
- Simon A**, Bierne N, Welch JJ. 2018. Coadapted genomes and selection on hybrids: fisher's geometric model explains a variety of empirical patterns. *Evolution Letters* **2**:472–498. DOI: <https://doi.org/10.1002/evl3.66>
- Simon A**, Arbiol C, Nielsen EE, Couteau J, Sussarellu R, Burgeot T. 2019. Replicated anthropogenic hybridisations reveal parallel patterns of admixture in marine mussels. *bioRxiv*. DOI: <https://doi.org/10.1101/590737>
- Śmietanka B**, Burzyński A. 2017. Disruption of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA associated with hybridization area of European *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus* in Norway. *Marine Biology* **164**:209. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00227-017-3235-5>, PMID: 29056761
- Strakova A**, Ní Leathlobhair M, Wang G-D, Yin T-T, Airikkala-Otter I, Allen JL, Allum KM, Banske-Issa L, Bisson JL, Castillo Domracheva A, de Castro KF, Corrigan AM, Cran HR, Crawford JT, Cutter SM, Delgadillo Keenan L, Donelan EM, Faramade IA, Flores Reynoso E, Fotopoulou E, et al. 2016. Mitochondrial genetic diversity, selection and recombination in a canine transmissible Cancer. *eLife* **5**:e14552. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.14552>

- Suquet M**, de Kermoisan G, Araya RG, Queau I, Lebrun L, Le Souchu P, Mingant C. 2009. Anesthesia in Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* **22**:29–34. DOI: <https://doi.org/10.1051/alr/2009006>
- Zbawicka M**, Wenne R, Burzyński A. 2014. Mitogenomics of recombinant mitochondrial genomes of baltic sea Mytilus mussels. *Molecular Genetics and Genomics* **289**:1275–1287. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0888-3>, PMID: 25079914
- Zbawicka M**, Trucco MI, Wenne R. 2018. Single nucleotide polymorphisms in native south american Atlantic coast populations of smooth shelled mussels: hybridization with invasive european Mytilus galloprovincialis. *Genetics Selection Evolution* **50**:5. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12711-018-0376-z>

--- Annexe 2 ---

Etude de la réponse des moules *Mytilus edulis* à l'allogreffe et la xenogreffe d'hémocytes sains.

Objectifs de l'expérimentation

Les cancers transmissibles sont des microparasites eucaryotes unicellulaires qui ont des génomes proches de ceux de leurs hôtes. Dans ce contexte, les mécanismes d'histocompatibilité apparaissent importants à comprendre et à caractériser pour pouvoir comprendre les réponses anticancéreuses des organismes affectés par ce type de cancers. En parallèle de l'expérimentation décrite dans le **chapitre 3**, nous avons donc réalisés une expérimentation d'allogreffe (*M. edulis*) et de xénogreffes (*M. galloprovincialis* et *Crassostrea gigas*) d'hémocytes sains dans des hôtes *M. edulis* pour pouvoir étudier les bases moléculaires des réponses induites par la greffe. Les hémocytes des donneuses ont été prélevés, dénombrés, puis 100 000 cellules du mélange ont été injectées à chaque receveuses. Les moules receveuses ont ensuite été prélevées *in toto* et mise en azote 3h et 24h après injection afin de pouvoir suivre la cinétique de la réponse en transcriptomique.

Matériel et méthodes

L'ensemble des animaux utilisés provenait de lots générés et maintenus dans les laboratoires Ifremer d'Argenton et de Bouin. Pour les individus receveurs, nous avons utilisé quatre familles biparentales de moules *M. edulis*. Les individus donneurs de l'allogreffe étaient issus d'une cinquième famille de *M. edulis*. Pour la xénogreffe, l'ensemble des individus donneurs *M. galloprovincialis* étaient issus d'une même famille biparentale, et les donneuses *C. gigas* correspondaient à une famille multiparentale ASI (Adulte Standardisé Ifremer). Pour toute la durée de l'expérimentation les animaux ont été maintenus en milieu contrôlé, dans des circuits fermés de la station expérimentale basée à Palavas-les-flots.

Avant de réaliser les injections expérimentales d'hémocytes sains, les animaux donneurs et receveurs ont été acclimatés durant 13 jours. Quotidiennement, l'eau des bacs était renouvelée et les animaux étaient nourris avec une préparation concentrée de microalgues. Au septième jour d'acclimatation, les individus receveurs ont été étiquetés et fixés sur des grilles afin de limiter l'endommagement des filaments de byssus lors de l'injection et des prélèvements post-injection, et ainsi limiter les biais par rapport aux réponses que nous cherchions à caractériser.

Similairement au protocole décrit dans le **chapitre 3**, l'expérimentation de greffe s'est déroulée en plusieurs étapes : (i) l'anesthésie des animaux donneurs et receveurs, (ii) le prélèvement d'hémolymphe des individus donneurs et la préparation des inocula (comptage des cellules, retrait du plasma par centrifugation puis resuspension des culots de cellules en eau de mer filtrée stérile, mélange des hémocytes issus des différents donneurs d'une même condition, ajustement de la concentration en

cellules pour arriver à une dose de 100 000 cellules pour 100µl) et (iii) l'injection de 100µl du mélange d'hémocytes sains de chaque condition dans différents individus receveurs. En guise de contrôles, certains individus ont reçu une injection d'eau de mer filtrée à 0.2µm et stérile (SSW) tandis que d'autres n'ont reçu aucune injection (naïf, NI). Les animaux receveurs issus des 4 familles de moules ont ensuite été répartis dans quatre bacs (jardins communs) pour pouvoir tester la répétabilité de l'expérimentation (FIGURE A2.1). Au moment de l'injection l'ensemble des individus naïf ont été prélevés (0h) tandis que le reste des individus ayant reçu une injection ont été prélevés 3h et 24h post-injection (FIGURE A2.1). Après avoir décroché la chair de la coquille, l'animal entier était déposé dans une coupelle individuelle remplie d'azote liquide. L'intégralité des échantillons ont été maintenus en azote liquide jusqu'au broyage.

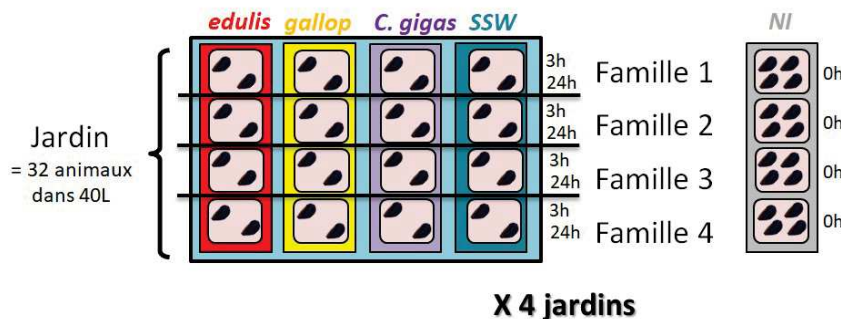


FIGURE A2.1 : Diagramme du plan d'injection expérimentale et de la composition des différents jardins. NI : individus naïfs n'ayant pas reçu d'injection, SSW : individus ayant reçu une injection d'eau de mer filtrée stérile, *C. gigas* : xenogreffe d'hémocytes d'huître *Crassostrea gigas*, *gallop* : xenogreffe d'hémocytes de moules *Mytilus galloprovincialis*, *edulis* : allogreffe d'hémocytes de moule *M. edulis*.

Les individus receveurs ont ensuite été broyés individuellement dans l'azote liquide puis l'ARN a directement été extrait à partir des poudres produites, avant d'être envoyé pour analyse RNAseq. Le RNAseq a été réalisé par l'entreprise DIAG4ZOO, sur un Illumina Novaseq après que les ADNc aient été générés par transcription inverse à partir des échantillons d'ARN et sélectionnés sur queue polyA. Le séquençage a été réalisé en 2x150pb *paired-end* avec une profondeur moyenne de 20 millions de *reads* par échantillons.

De la même manière que pour le **chapitre 3**, les *reads* bruts ont été nettoyés en retirant les adaptateurs (*TrimGalore* version 0.6.3, [Martin, 2011](#)) et les ARN ribosomaux (*Bowtie2* version 2.3.5, [Langmead & Salzberg, 2012](#)) et en corrigeant les erreurs de séquençage (*Rcorrector* version 1.0.4, [Song & Florea, 2015](#)). La qualité des banques a ensuite été évaluée avec *FastQC* version 0.11.8 ([Andrews, 2010](#)). Les

reads nettoyés ont ensuite été alignés sur le génome de référence *M. galloprovincialis* (Gerdol et al., 2020) à l'aide de l'outil RNAstar version 2.7.8a (Dobin et al., 2013). Le comptage des *reads* a été réalisé avec HTSeq-count version 0.9.1 (Anders, Pyl, & Huber, 2015).

Analyses et résultats

Une première étape d'Analyse en Composante Principale (ACP, fonction *plotPCA()* du package *DESeq2*, Love, Huber, & Anders, 2014) a été réalisée à partir de la matrice de comptage *log* normalisée (fonction *count()* du package *DESeq2*). L'ACP a révélé un fort effet de la famille biparentale d'origine et nous a mené à réaliser une Analyse de Redondance partielle (RDA, fonction *rda()* du package *vegan*, Oksanen et al., 2020) afin d'expliquer la matrice de comptage normalisée par les différentes conditions (contrôle naïf, contrôle eau de mer, allogreffe et les deux xénogreffes), en retirant la variance induite par les variables *famille* et *jardin* (FIGURE A2.2).

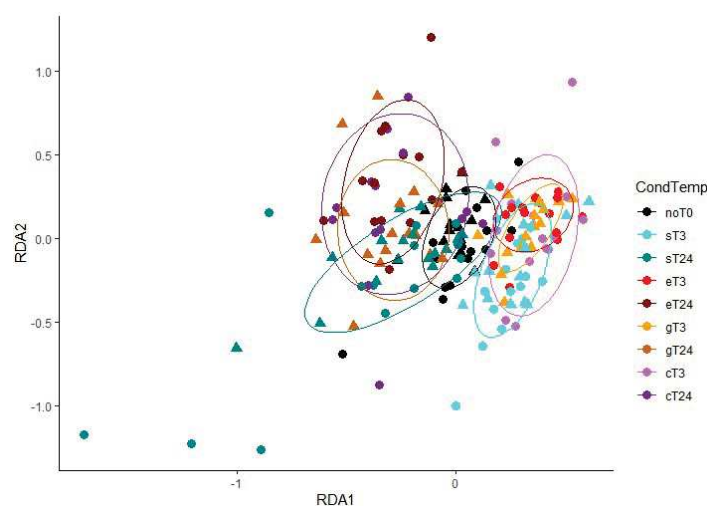


FIGURE A2.2 : Analyse de redondance partielle montrant un regroupement des individus receveurs par temps de prélèvement post-injection (3h vs. 24h). En noir les individus de la condition contrôle sans injection (naïf, noT0), en bleu les individus de la condition contrôle d'injection d'eau de mer (s), en rouge les individus de la condition allogreffe (hémocytes de *Mytilus edulis*), en orange les individus de la condition xénogreffe (hémocytes de *M. galloprovincialis*) et en violet les individus de la condition xénogreffe (hémocytes *Crassostrea gigas*). Les couleurs claires correspondent aux individus prélevés 3h après injection et les couleurs foncées à ceux prélevés 24h après injection.

La RDA partielle montre que la part de variance expliquée par les différentes conditions est de 1%, celle des variables retirées est de 31%, et la part des résidus s'élève à 67%. La représentation graphique des résultats de la RDA partielle montre une bonne séparation entre les deux temps de prélèvements (RDA1, proportion expliquée de 41%), mais pas de séparation marquée entre les différentes conditions

d'injection. Il est tout de même intéressant de noter que les différentes conditions semblent moins similaires entre elles 24h après l'injection que 3h post-injection.

Pour chacune des familles indépendamment, une analyse différentielle d'expression de gènes a ensuite été réalisée en comparant la condition contrôle d'injection d'eau de mer aux conditions d'allogreffe et de xéngreffe. Dans l'ensemble des comparaisons, entre seulement 4 et 72 gènes sont retrouvés différentiellement exprimés et, pour les gènes ayant une annotation fonctionnelle disponible, peu appartiennent à des familles de protéines connues pour leur rôle dans la réponse immunitaire ou l'inflammation. A ce stade de l'analyse, il semble donc que les différences de réponses induites ne soient pas fortes entre l'injection d'eau de mer et les différentes injections d'hémocytes sains. Des analyses complémentaires seront nécessaires pour essayer de mieux caractériser les réponses induites, notamment en comparant les différentes conditions d'injections à la condition témoin naïf, ainsi que les différentes conditions de xéngreffes et d'allogreffe directement entre elles.

Références

- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, *31*(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU638>
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online.
- Dobin, A., Davis, C., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., ... Gingeras, T. . (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *29*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTS635>
- Gerdol, M., Moreira, R., Cruz, F., Gómez-Garrido, J., Vlasova, A., Rosani, U., ... Figueras, A. (2020). Massive gene presence-absence variation shapes an open pan-genome in the Mediterranean mussel. *Genome Biology* *2020 21:1*, *21*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S13059-020-02180-3>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* *2012 9:4*, *9*(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* *2014 15:12*, *15*(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, *17*(1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/EJ.17.1.200>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., ... Maintainer, H. W. (2020). Package “vegan” - Community Ecology Package Version 2.5-7.
- Song, L., & Florea, L. (2015). Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads. *GigaScience* *2015 4:1*, *4*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S13742-015-0089-Y>

--- Annexe 3 ---

Article 4 : Transmissible cancerous cells evolved adaptations to a marine parasitic lifestyle in mussels



OPEN

Traits of a mussel transmissible cancer are reminiscent of a parasitic life style

E. A. V. Burioli^{1✉}, M. Hammel^{1,2}, N. Bierne², F. Thomas³, M. Houssin^{4,5},
D. Destoumieux-Garzón¹ & G. M. Charrière¹

Some cancers have evolved the ability to spread from host to host by transmission of cancerous cells. These rare biological entities can be considered parasites with a host-related genome. Still, we know little about their specific adaptation to a parasitic lifestyle. MtrBTN2 is one of the few lineages of transmissible cancers known in the animal kingdom. Reported worldwide, MtrBTN2 infects marine mussels. We isolated MtrBTN2 cells circulating in the hemolymph of cancerous mussels and investigated their phenotypic traits. We found that MtrBTN2 cells had remarkable survival capacities in seawater, much higher than normal hemocytes. With almost 100% cell survival over three days, they increase significantly their chances to infect neighboring hosts. MtrBTN2 also triggered an aggressive cancerous process: proliferation in mussels was ~17 times higher than normal hemocytes (mean doubling time of ~3 days), thereby favoring a rapid increase of intra-host population size. MtrBTN2 appears to induce host castration, thereby favoring resources re-allocation to the parasites and increasing the host carrying capacity. Altogether, our results highlight a series of traits of MtrBTN2 consistent with a marine parasitic lifestyle that may have contributed to the success of its persistence and dissemination in different mussel populations across the globe.

Whether cancers belong to the host entity at the moment they start uncontrolled proliferation may be debated. Indeed, cancers could instead be considered as parasites having evolved from their host. In fact, after accumulating hundreds of mutations, the genome of cancerous cells diverges from the host genome with its own dynamics and genetic variation, becoming a new organism, composed of cheating cells, inside the multicellular host¹. This organism is unable to survive autonomously without the host, from which it diverts the energy and resources necessary for its survival and growth, similarly to parasites^{2,3}. But could it really be defined as a parasite?

Parasitism is defined as a form of symbiosis—an intimate relationship between two different species, in which the parasite cannot survive without its host while harming it in some way⁴. The parasitic lifestyle requires adaptations for several key events including between-host transmission and host colonization⁵. In order to survive, parasites have to be able to efficiently transmit between hosts, whereas cancers do not usually survive beyond the death of their original host. The parasitic status of classical cancers could be disputed on this basis—being non-contagious, the evolutionary life of classical cancers might be considered too short for them to be qualified as parasites.

However, some cancers have evolved the ability to transmit from host to host (see review⁶). Transmissible cancers are malignant cell lines, derived from a founder host, that have evolved the ability to spread from host to host by transmission of living cancerous cells. Indeed, they can be thought of as atypical parasitic life forms: parasites with a host-related genome. The transmissibility of these cancerous cell lines has been demonstrated through i) the presence of genetic chimerism in the diseased animals, with genetic differences between tumor and host cells, and (ii) the genetic similarity between tumors of different individuals. To date, several lineages of transmissible cancers have been described: one in dogs (Canine Transmissible Venereal Tumor, CTVT^{7,8}), two in Tasmanian devils (Devil Facial Tumor Disease, DFT1 and 2^{9,10}), and seven in various bivalve families (Bivalve Transmissible Neoplasia, BTN)^{11–14}. Among BTNs, MtrBTN1 and MtrBTN2 are two distinct lineages with a *Mytilus trossulus* origin that infect mussel species of the genus *Mytilus*. MtrBTN2 has been observed in *M. trossulus*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, and *M. chilensis*, showing that their transmission can cross the species

¹IHPE, Univ Montpellier, CNRS, IFREMER, Univ Perpignan Via Domitia, Montpellier, France. ²ISEM, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France. ³CREEC/CANECEV (CREES), MIVEGEC, Unité Mixte de Recherches, IRD 224–CNRS 5290–Université de Montpellier, Montpellier, France. ⁴LABÉO, Caen, France. ⁵Normandie Université, Université de Caen Normandie, FRE BOREA, CNRS-2030, IRD-207, MNHN, UPMC, UCN, Caen, France. ✉email: erika.burioli@ifremer.fr

barrier^{12,13,15,16}. MtrBTN2 has been detected on several continents—South America, Asia, and Europe—^{13,15–17}. It seems to have a fairly constant low prevalence among years and sites, indicating that it could be an endemic disease throughout the world. The low prevalence suggests that resident strains of hosts and parasites may have reached a population dynamic equilibrium, meaning that co-evolutionary processes are occurring.

Adaptations to a parasitic lifestyle have been supported by experimental data in Tasmanian devil and dog transmissible cancers, for which contact-dependent transmission routes have been characterized^{18,19}. But because mussels are sessile animals, infectious agents must travel from host to host in the open seawater. Therefore, they must be able to survive outside their original host until they find a new host to infect. This trait is also of crucial importance for epidemiological predictions. Sunila and Farley²⁰ reported that "sarcoma cells" from the soft-shell clam *Mya arenaria* were able to survive at least 48 h in seawater (Temperature = 24 °C, Salinity = 15 g/L). This cancer is very likely to be the same BTN lineage subsequently evidenced by Metzger et al.¹¹, however, characterization of survival capacities in the outside-host environment is lacking for cancer cells unambiguously demonstrated to be transmissible.

Host colonization success depends also on the ability of parasites to proliferate in their hosts. BTNs are characterized by the proliferation of large, rounded, basophilic and polyploid cells with a high nucleus-to-cell ratio²¹ that can be found circulating in the hemolymph and invading vesicular connective tissues. Several histological studies indicated a significant amount of mitotic cells within the connective tissue, indicating that BTN cells actively proliferate^{17,22} although flow cytometry analyses of DNA content per cell have not revealed any significant signal of mitotic neoplastic cells circulating in the hemolymph^{16,17}. Therefore accurate quantifications of BTN proliferation rate are still missing.

As a consequence of their lifestyle, parasites often have profound effect on the fitness of their hosts. When parasites harbor significant multiplication rates, the intra-host load that can be reached depends strongly on the host resources available for parasite population growth (i.e. host carrying capacity). An increased host carrying capacity can be achieved by manipulating host energetic resources to the parasite profit and by curbing the decrease in host viability. As a consequence, many different parasites can override the host's resources allocation strategy by limiting the energy devoted to host reproduction. Castrator parasites annihilate the reproductive ability of their host to their own advantage, but they keep their host alive to ensure their own long life²³. The abundant literature on bivalve "disseminated neoplasia"—which can be suspected to be BTN in most cases, even though genetic analyses were missing to confirm transmissibility—reported equivocal results concerning the effects of neoplasia on gametogenesis^{24–29}. But we still ignore the consequences of MtrBTN2 invasion on the mussel energetic resources and reproductive cycle.

In the present work, we aimed to investigate the parasitic traits of MtrBTN2, by focusing on i) MtrBTN2 survival capacity in the environment, which is essential for the transmission and persistence in mussel populations over time; ii) MtrBTN2 proliferation rate within *M. edulis* host; iii) the cost of MtrBTN2 infection on the host fecundity.

Our results show that MtrBTN2 harbors phenotypic characteristics that make it apparently adapted to a parasitic lifestyle and indicate that MtrBTN2 may be considered as a castrator parasite.

Results

Neoplastic cells belonging to the MtrBTN2 lineage were isolated from *Mytilus edulis* mussels farmed in Normandy (France). The prevalence of cancerous mussels was low in the sampling area (2.66%) with 39 positive individuals out of 1466, according to cytological observation of mussel hemolymph. Among the 39 cancerous mussels, 16 were also analyzed by histology (Supplementary Table S1). All were confirmed to carry cancerous cells in their tissues. As expected in the sampling area, these mussels were diagnosed to carry the MtrBTN2 lineage, being positive by qPCR for the EF1 α -i3 and mtCR-D genetic markers developed in this study (see Materials and methods) and by Yonemitsu et al.¹³, respectively (Supplementary Table S1).

MtrBTN2 cells survive several days in seawater. Surviving for few days in the outside-host marine environment is a prerequisite for MtrBTN2 cells to be able to contaminate new hosts. Therefore, we isolated MtrBTN2 cells from diseased mussels and compared their survival in seawater to normal hemocytes isolated from healthy mussels.

MtrBTN2 cells survival rate in seawater was significantly higher than that of hemocytes over 7 days (Mann–Whitney, $P < 0.05$; daily test statistics are reported in the Fig. 1 legend) with a median survival time of MtrBTN2 cells equal to 6 days, as opposed to 4 days only for hemocytes. The trend in survival rates of MtrBTN2 and hemocytes was very reproducible across three independent experiments, each one performed with cells isolated from distinct individuals. The daily percentage of living MtrBTN2 cells was close to 100% over the first three days (Fig. 1). MtrBTN2 cell survival started to decrease at day 4 only, and no cells remained viable after day 9. In contrast, hemocytes started to die from the first day of the experiment. In a second phase (day 3–5), hemocyte survival decreased at approximately the same rate of MtrBTN2 (day 4–8). In a third phase, the remaining hemocyte populations died more slowly until no living hemocytes remain at day 14. Comparable survival profiles were obtained were observed hemocyte populations from *M. galloprovincialis* or *Crassostrea gigas*, indicating that bivalve species had little effect on hemocyte survival capacity (Supplementary Fig. S1).

MtrBTN2 cells proliferate at a very high rate in vivo. The ability of MtrBTN2 cells to proliferate in mussels was measured in vivo by performing EdU incorporation assays. EdU is a thymidine analog that is incorporated during DNA synthesis in mitotic cells. Cell proliferation was compared in 4 cancerous and 4 healthy mussels. MtrBTN2 cells were characterized by a high proliferation capacity, more than 17 times higher than that of normal hemocytes in healthy mussels, as observed in mussel hemolymph after a 9 h labeling time

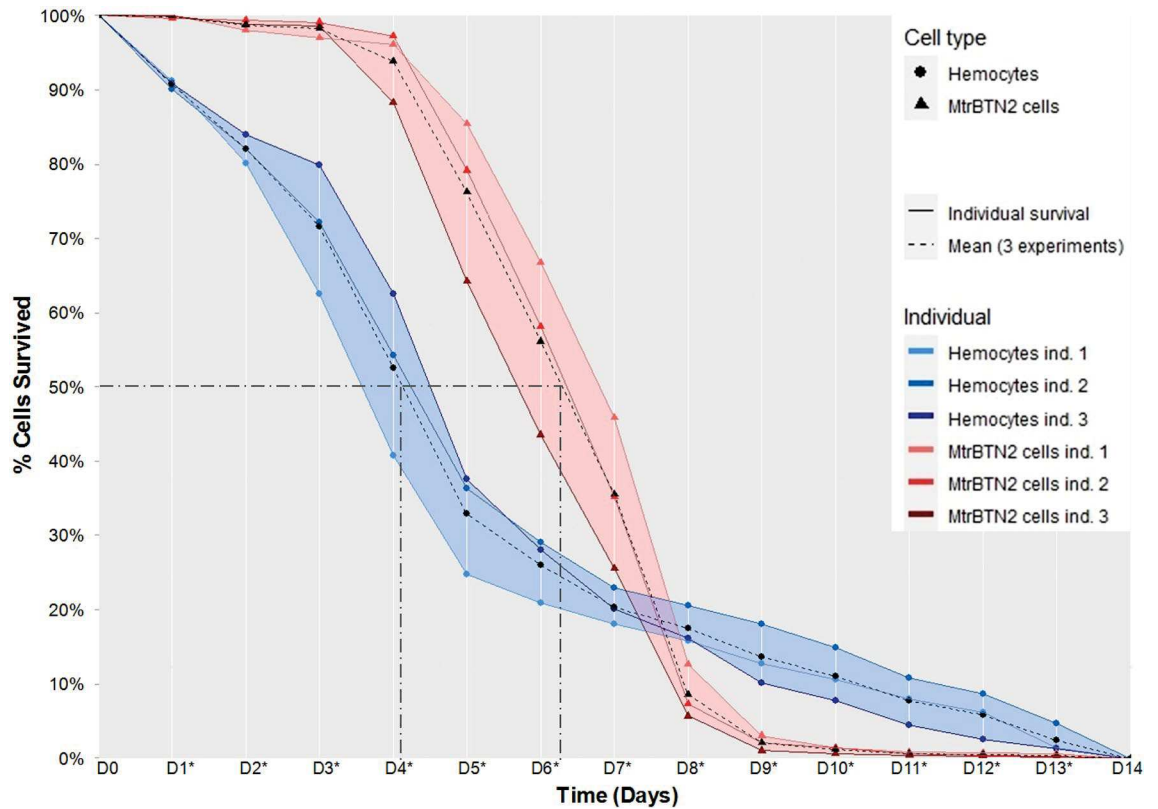


Figure 1. MtrBTN2 cells survive longer than hemocytes in seawater. The median survival rate was 6 days for cancerous cells and 4 days for hemocytes. Cells were seeded at a density of 2×10^4 cells/well and incubated at 18 °C for 14 days. Warm colors correspond to MtrBTN2 cells and cool colors correspond to hemocytes. Dotted lines are the means of three independent experiments from different individuals, solid lines are the means of the three wells from each individual; asterisks on x-axis labels indicate significant differences between MtrBTN2 and hemocytes' survival (Mann–Whitney; D₁, U = 1, P = 0.0005; D₂, P = 0.0002; U = 5; D₃, P = 0.00004, U = 0; D₄, P = 0.00003, U = 0; D₅, P = 0.00003, U = 0; D₆, P = 0.0003, U = 0; D₇, P = 0.0004, U = 0; D₈, P = 0.0004, U = 81; D₉, P = 0.0004, U = 81; D₁₀, P = 0.0003, U = 81; D₁₁, P = 0.002, U = 75; D₁₂, P = 0.01, U = 69; D₁₃, P = 0.03, U = 66).

	Multiplication rate	
	Cancerous (%)	Healthy (%)
Mussel 1	9.30	0.57
Mussel 2	17.07	0.96
Mussel 3	15.20	0.72
Mussel 4	28.15	1.69
Mean	17.43	0.99

Table 1. Cancerous mussels show high proliferation capacities. Multiplication rates are expressed as proportion of circulating cells having incorporated EdU in vivo 9 h after EDU injection. Cancerous and healthy mussels are compared, and all the MtrBTN2 cancerous individuals show significant higher multiplication rates (Mann–Whitney; U = 16, P = 0.028).

(Mann–Whitney, U = 16, P = 0.028). The proportion of circulating cells that underwent multiplication (cells having incorporated EdU in vivo) was 17.43% for MtrBTN2 (9.13 to 28.15%) and 0.99% for normal hemocytes (0.57 to 1.69%) (Table 1). A mean doubling time of about 74 h (~3 days) was calculated for MtrBTN2 cells from these results. Epifluorescence microscopy images of cells that have incorporated EdU in vivo are presented in Fig. 2.

MtrBTN2 affects mussel reproductive cycle. We next investigated the effect of MtrBTN2 on mussel physiology by histological analyses with a particular emphasis on reproductive cycle. For that we used cancerous and healthy mussels sampled from the field at various seasons. The reproductive status of all individuals was determined according to 4 histological stages (Table 2).

Most mussels infected with MtrBTN2 (69%) were in a resting stage 0 (11 out of 16 mussels), all seasons being considered, as opposed to only 5.8% of healthy mussels (1 out of 17) (Table 2). Not only cancerous mussels poorly

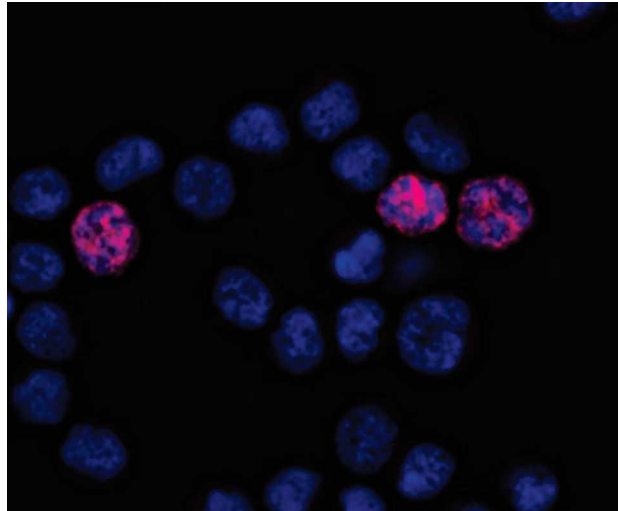


Figure 2. Labeling of MtrBTN2 cells with Click-iT EdU at the end of the in vivo EDU incorporation assay. Cells were withdrawn from the hemolymph and cytospun on a microscopy slide. EdU was labeled with Alexa Fluor 594 (red) and nuclei were counterstained with Hoechst 33,342 (blue). X400 magnification.

Gonadal stage	Nbr ind	Nbr ind./Sex			Nbr ind	Nbr ind./Sex		
		U	F	M		U	F	M
Late January								
Cancerous					Healthy			
Stage 0	N=1	1	0	0	N=0	-	-	-
Stage 1	N=3	3	0	0	N=0	-	-	-
Stage 2	N=0	-	-	-	N=0	-	-	-
Stage 3	N=0	-	-	-	N=4	0	2	2
Stage 4	N=0	-	-	-	N=0	-	-	-
July								
Cancerous					Healthy			
Stage 0	N=5	5	0	0	N=1	1	-	-
Stage 1	N=0	-	-	-	N=0	-	-	-
Stage 2	N=0	-	-	-	N=0	-	-	-
Stage 3	N=2	0	1	1	N=0	-	-	-
Stage 4	N=0	-	-	-	N=5	0	4	1
December								
Cancerous					Healthy			
Stage 0	N=5	5	0	0	N=0	-	-	-
Stage 1	N=0	-	-	-	N=2	2	0	0
Stage 2	N=0	-	-	-	N=6	0	4	2
Stage 3	N=0	-	-	-	N=0	-	-	-
Stage 4	N=0	-	-	-	N=0	-	-	-

Table 2. Mussels infected by MtrBTN2 show poor gonadal development. Stage 0: resting; stage 1: gonia proliferation; stage 2: all gamete developmental stages present with only a few mature gametes; stage 3: predominance of ripe gametes; stage 4: resorption. I: undifferentiated gonad; F: female; M: male. The dominant stage is indicated in bold.

entered into reproduction, but when they did, the process was delayed compared to the seasonal reproduction cycle of healthy *M. edulis*. Indeed, only healthy mussels followed the expected cycle observed for animals from the Atlantic coast of France³⁰ (Fig. 3A–B). In late January, all healthy individuals had ripe gametes typical of reproductive stage 3 (Fig. 4A,B), whereas mussels affected by MtrBTN2 were at resting stage 0 (Fig. 4C) or gonia proliferation (stage 1) only (Fig. 4D). In July, healthy individuals were mostly at resorption stage 4 (Fig. 4E) and resting stage 0 (Fig. 4F), indicating that the reproductive season had ended and that the reconstitution of the energy storage in adipogranular cells (ADG) within the connective tissue had started (stage 0). On the same

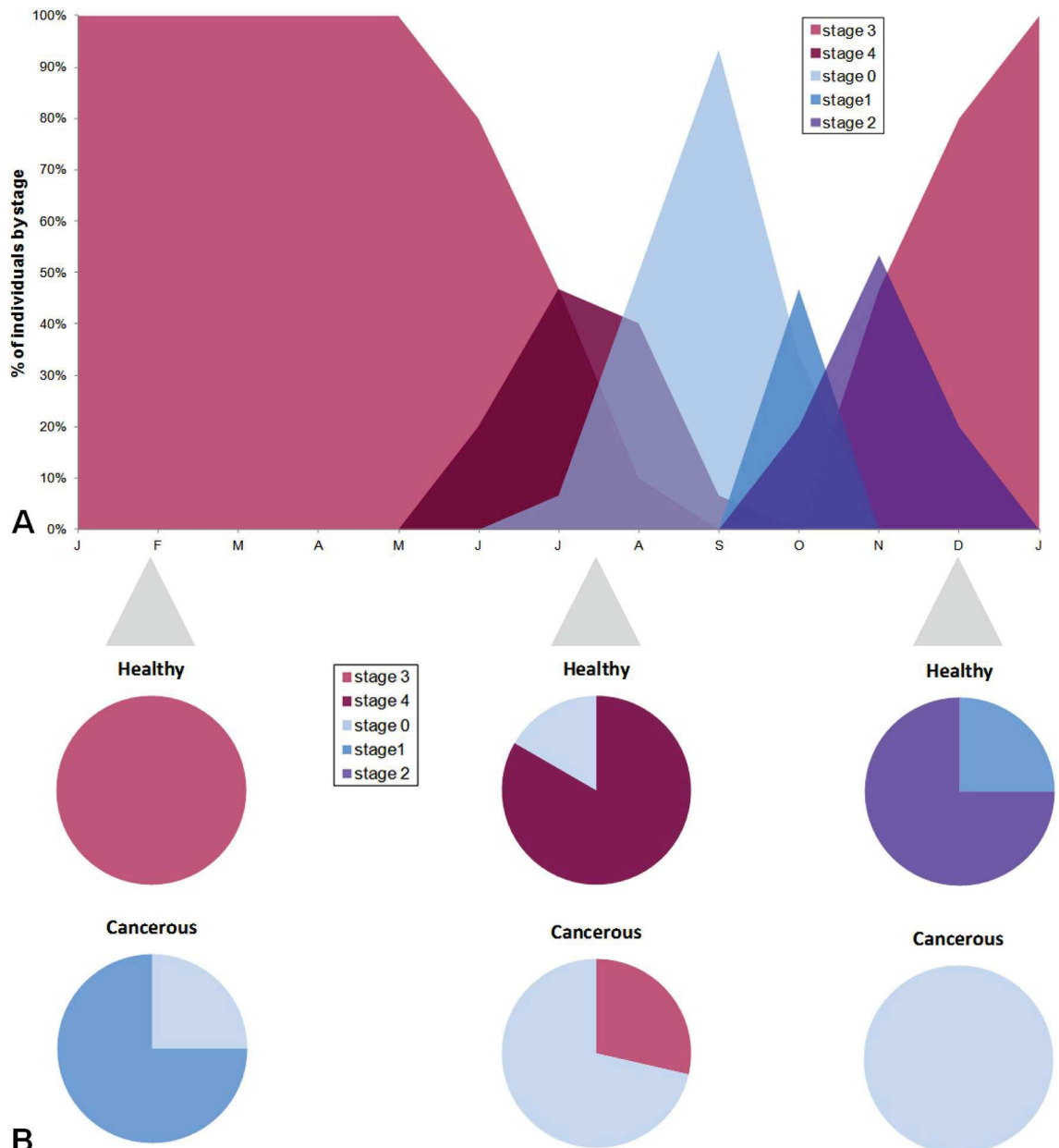


Figure 3. Gonadal development is delayed in MtrBTN2-affected (cancerous) mussels. (A) reference study in healthy Atlantic mussels (data from Randriananja³⁰); (B) seasonal results from the present study comparing healthy and cancerous mussels. Stage 0: resting; stage 1, gonia proliferation; stage 2: all developmental stages present with only few mature gametes; stage 3: predominance of mature gametes; stage 4: resorption.

date, no cancerous mussels were at resorption stage but two individuals had ripe gametes. One was a female, in the initial stage of neoplasia: no gametogenesis process was still in course in the follicle wall (Fig. 4G); the number of oocytes was low and the small follicle size indicated that no spawning had occurred. The second was a male at a mid-stage of neoplasia (Fig. 4H) and at a slightly earlier stage of gametogenesis than the female since various developmental stages were present even though mature spermatozoa were abundant. Interestingly, while ADG cells were absent in the connective tissues of healthy mussels at reproductive stages 3 (Fig. 4A and E), we observed numerous ADG cells in both cancerous individuals with mature gametes. These observations suggest that gametogenesis might be inhibited soon after infection by MtrBTN2. In December, gametogenesis was observed in healthy individuals while no gametogenesis was observed in cancerous mussels.

Discussion

In this study, we identified phenotypic traits of cancerous cells that may explain MtrBTN2 successful transmission and persistence in host populations worldwide. These traits encompass their ability to persist in the outside host environment and to proliferate at high rate in diseased mussels. We also observed an early cancer-induced castration in the diseased host, probably favoring host carrying capacity and/or malignant cells' proliferation.

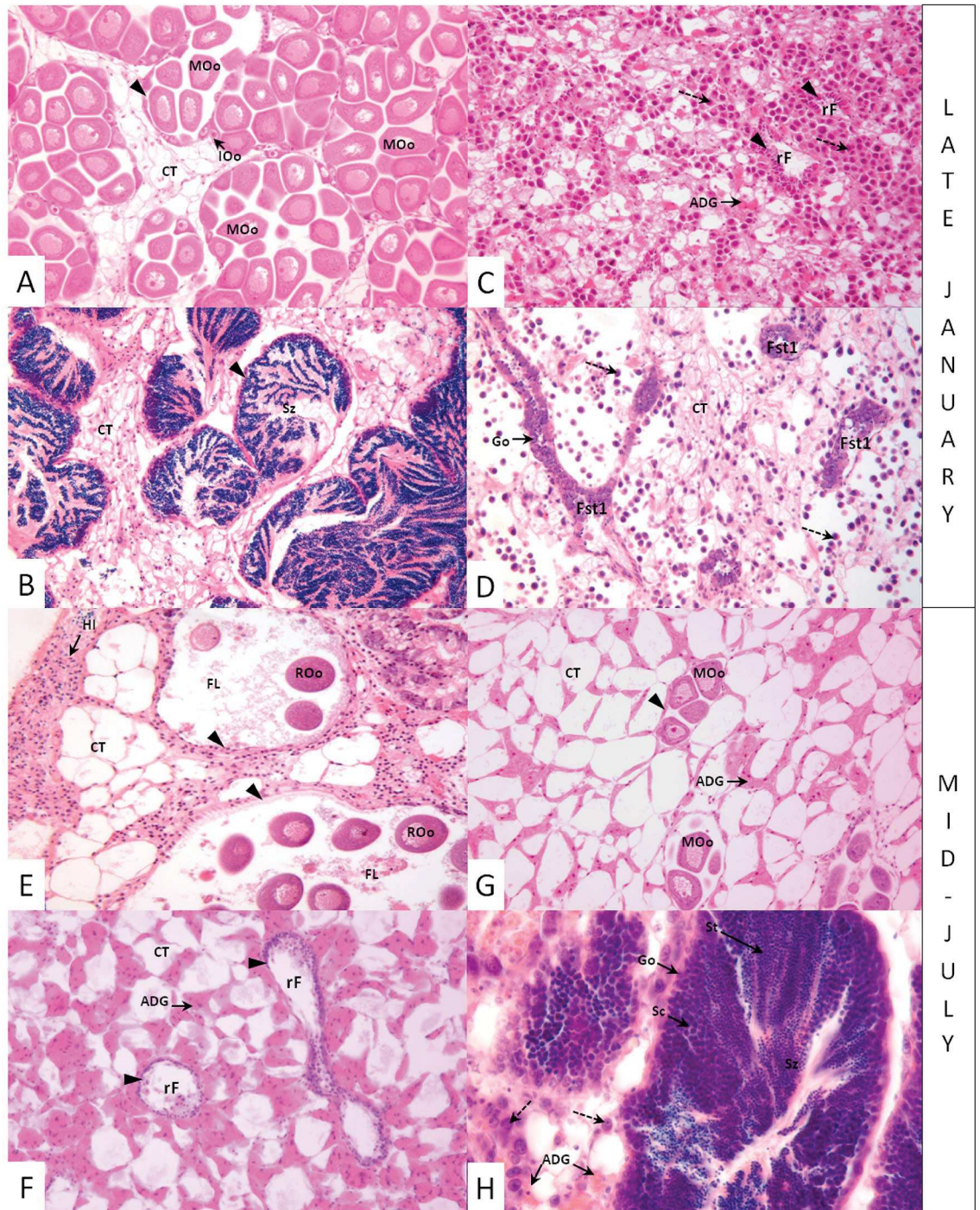


Figure 4. MtrBTN2 alters the gonadal development of *Mytilus edulis* and influences the amount of energetic resources. Histological micrographs of mussel gonads. Healthy mussels: (A, B, E, F). Cancerous mussels: (C, D, G, H). ADG: adipogranular cell; CT: connective tissue; FL: follicle lumen; Fst1: follicle stage 1; Go: gonia; IOo: Immature oocytes; MOo: mature oocytes; rF: resting follicle; ROo: residual oocyte; Sc: spermatocyte; St: spermatid; Sz: spermatozoa; arrow head: follicle wall; dotted arrows: cancerous cells. X200 magnification.

Although the transmission process remains unknown, survival in open seawater is a prerequisite for BTNs to behave as parasites. We demonstrated here that 50% of the MtrBTN2 cells are still alive after 6 days in seawater as opposed to 4 days for hemocytes. Although we could not measure survival of *M. trossulus* hemocytes, as this mussel species is not present in France, we showed that hemocytes from 3 bivalve species (*M. edulis*, *M. gallo-provincialis* and *Crassostrea gigas*) display similar survival in seawater. Therefore, MtrBTN2 cells survive better than hemocytes in seawater over 7 days, and this is not due to the species from which cancer cells originated but it is rather a cancer specific difference.

The particular survival capacity of MtrBTN2 cells in seawater is of crucial importance for disease epidemiology since after leaving the host, MtrBTN2 cells could be transported for more than six days by marine currents to neighboring mussel hosts. Seawater is a diffusive and dilutive media. The probability that an inoculate of a sufficient number of infective cancerous cells meet a new permissive host quickly decreases with time and distance. Cell dilution and host densities may therefore greatly limit long-distance transmission success, similar to external fecundation of broadcast spawners that decrease in effectiveness at scales above a few meters³¹. The interest for a non-motile marine parasite should not be to increase its survival indefinitely, but mainly during the first hours after release as observed here with MtrBTN2 cells, which showed no mortality during the first 3 days. For comparison, *Bonamia ostreae*, a protistan parasite of the European flat oyster with a direct life cycle, is viable at 70% after 2 days in seawater³². Mechanisms used by MtrBTN2 cells to survive for 3 days in a non-physiological and nutrient-poor environment like seawater will require further investigations to elucidate whether they harbor particular metabolic adaptations.

The capacity of MtrBTN2 cells to survive in a nutrient-poor environment raises the question whether it results from a specialization to a parasitic lifestyle allowing for transmission through open seawater, or whether, it was inherited from the tissular origin of the primary tumor that remains unknown so far. The MtrBTN2 cells' death curve with one single phase of mortality (day 4–9) suggests a strong synchronicity of cancerous cells' death, which is in accordance with the clonal theory of neoplastic cells^{33,34}. On the contrary, the hemocyte death curve harbor a multi-modal rate of death with different slopes over the 3 successive phases. This is probably due to the heterogeneity of the hemocyte populations. In fact, at least 3 main cell types have been described in the hemolymph of bivalve mollusks^{17,35–37} and may have different survival capacities. It can be speculated that MtrBTN2 cells have derived from one hemocyte subpopulations.

We have shown here that MtrBTN2 is an aggressive cancerous process whose active proliferation in vivo favors a rapid increase of intra-host population size. We estimated a mean doubling time of about 3 days. For comparison, the shortest doubling times in vivo of leukemic blast cells in acute leukemias and solid tumors were estimated at 5–10 days^{38–41}. Short doubling times were also described in eukaryotic marine microparasites such as *Perkinsus marinus* (3–7 days)⁴². Several histological studies have described a high mitotic rate of mussel cancers within the vesicular connective tissue^{17,22} but, according to the flow cytometry analyses of the DNA content, no proliferation occurs in the hemolymph^{16,17}. A possible explanation is that cancerous cells proliferate in the connective tissue before reaching the hemolymph. This circulating stage may be of prime importance in terms of transmission. Indeed, there is a permanent cell exchange between hemolymph and intravalvular fluids in bivalves. Recently, Caza et al.⁴³ showed that under temperature stress conditions, circulating hemocytes were able to leave the hemolymph to gain access to the intervalvular fluid before entering other mussels. Therefore, hemolymph is a likely route for the leakage of cancerous cells outside the infected host.

Our results show that MtrBTN2 seems to act as a parasitic castrator—a common adaptive strategy in marine animal parasites⁴⁴. Although we cannot exclude the hypothesis that it could simply be a by-product of the infection with no adaptive value^{45,46}, a possible reason is that MtrBTN2 uses energetic resources from the host to sustain such a high intra-host proliferation. Indeed, one way that parasite can manipulate their host to access resources is to interfere with reproductive traits by castration thus favoring the re-allocation to these resources to the parasites and increasing the host carrying capacity²³. MtrBTN2 was found to infect both sexes. Although the very low prevalence of the disease limits this kind of study due to modest sample size, we nonetheless observed clear differences between neoplastic and healthy individuals in terms of gonadal development. Interestingly, the progression of gametogenesis appeared altered in all cancerous individuals. All but five of the MtrBTN2-affected individuals showed no reproductive activity at all, and gametogenesis was delayed in those five remaining individuals compared to healthy mussels. Two of these five individuals had ripe gametes. While healthy individuals at this stage of the reproductive cycle have low energy reserves and few or no ADG cells, the two neoplastic individuals had many ADG cells, corroborating the observations of Cremonte et al.⁴⁷ for *M. chilensis* from southern Argentina affected by disseminated neoplasia. According to these observations, we can hypothesize that gametogenesis is blocked soon after infection by MtrBTN2, at the stage reached at this time, and that the cancerous parasite potentially has a manipulative role.

Theory postulates that cancer lineages and parasites able to manipulate phenotypic traits in the host in ways that favor their proliferation and/or transmission to novel hosts should achieve higher fitness and consequently be favored by selection. However, host manipulation by cancer cells has not been extensively studied until now, even though the existence of strategies manipulating the host and leading to increased tumor fitness have been hypothesized⁴⁸. Our study unravels that MtrBTN2 behaves as a castrator parasite by manipulating mussel hosts reproductive cycle. A decrease in fecundity of diseased animals can possibly further alter host population dynamics⁴⁹. However, the low prevalence observed in mussel populations suggests a limited impact on host demography overall, possibly because resistant hosts have been selected through time. To persist, the parasite must therefore evolve continuously to adapt to its co-evolving host population.

From our present work, MtrBTN2 harbors traits consistent with a marine parasitic lifestyle. The presence of MtrBTN2 year-round in mussel populations⁵⁰ suggests that no resistant or latent phases of this parasite are necessary for the persistence of the parasite and that continuous transmission occurs. The ability of MtrBTN2 to survive in seawater is likely a key determinant of its efficient transmission and diffusion in mussel populations worldwide. A more comprehensive view of MtrBTN2 transmission will require additional research on the ways that infective cancer cells leave their host and enter a new host. Beyond key phenotypic traits for transmission, we found that MtrBTN2 has characteristics of various type of parasites: microparasites⁵¹—as they multiply at very high rate within the host, and castrator parasites⁵²—as they seem to prevent host reproduction. According to these results, MtrBTN2 could be classified within unicellular parasitic diseases. Altogether, our results indicate that MtrBTN2 cancer cells behave like unicellular castrator parasites.

Locus	Primer	Amplicon length (bp)	Source
EF1 α -i3	EF1 α -i3-F: 5'-GGTGATGCACACCACATTCATTAG	210	Newly designed
	EF1 α -i3-R: 5'-TCTGGATTCCATGAATCGGGAC		
mtCR-D	MchmtAB-DF6: 5'-GTACTTCATTCCTTGCCA	60	Yonemitsu et al. ¹³
	MchmtAB-DR2: 5'-AAAAGACAGGTGGAAAGGGGT		

Table 3. Primer sequences used for qPCRs.

Materials and methods

Mussel origin and MtrBTN diagnostic. All *Mytilus edulis* mussels, used for survival and proliferation tests were collected in July 2020 from an aquaculture farm in Agon-Coutainville (Normandy, Channel, France). Mussels were acclimated for two weeks at 14 °C in filtered seawater supplemented with a microalga diet. Gonadal stage assessment of these individuals was carried out, as well as for additional mussels sampled in the same site in late January and early December.

The presence of circulating neoplastic cells and the disease stage were diagnosed by cytological examination according to Burioli et al.¹⁷. To confirm the MtrBTN2 diagnosis, we targeted two genetic markers, one mitochondrial *mtCR-D* (MtrBTN2-specific¹³) and one nuclear EF1 located on intron 3 (EF1 α -i3) (*M. trossulus*-specific, newly designed and described below). Briefly, a piece of mantle and gill were fixed in 96% ethanol, and DNA extraction was accomplished with the Nucleomag 96 Tissue kit (MACHEREY-NAGEL). We followed the manufacturer protocol with modified volumes of some reagents: beads were diluted 2 \times in water, 200 μ L of MB3 and MB4, 300 μ L of MB5, and 100 μ L of MB6. For *mtCR-D* marker amplification, we used the primer pair and the two-step cycling stage protocol (95 °C for 15 s and 60 °C for 30 s, for 40 cycles) designed by Yonemitsu et al.¹³. For EF1 α -i3 qPCR development, we used sequences of Faure et al.⁵³ and Bierne⁵⁴ to design a primer pair that specifically amplifies *M. trossulus* (Supplementary Fig. S2). Table 3 presents information on qPCR primer pairs. For amplification, we used a three-step cycling stage protocol (95 °C for 10 s, 58 °C for 20 s, 72 °C for 25 s) for 40 cycles. We carried out both qPCRs using the sensiFAST SyBR No-ROX Kit (meridian BIOSCIENCE) and the LightCycler 480 Real-Time PCR System (ROCHE).

Neoplastic cell survival capabilities in the environment. For the experiment, we selected three advanced-stage neoplastic *Mytilus* (>95% of cancerous cells in the hemolymph) and three healthy individuals. At D₀ after acclimatization, mussels were anesthetized by bathing them for 30 min in a solution containing 50 g/L of magnesium chloride dissolved in 2:1 distilled water: sterile seawater⁵⁵. We drew 100 μ L of hemolymph from each individual with a 26G syringe containing 200 μ L of Alsever solution to avoid cell aggregation. Cells were pelleted at 600 \times g for 10 min at 14 °C and resuspended in sterile natural seawater (0.22 μ m filtered and autoclaved) supplemented with penicillin/streptomycin and 1 nM SYTOX Green (invitrogen) to a concentration of 20,000 cells per mL. For each individual, we placed 1 mL of this cell suspension in five wells of a 24-well cell culture plate. Of these five wells, three were used as a triplicate for the individual cell survival tests and two were used as controls by the addition of Triton-X100 (0.1%) to kill cells by membrane permeabilization and to obtain the fluorescence value of 100% cell death. These controls were also used to verify that the fluorescence did not decrease during the experiment. The six plates (from three neoplastic and three healthy individuals) were covered and placed in a cell culture incubator at 18 °C with humidity maintained at 98%. The fluorescence value of each well was measured daily at 480 nm/520 nm with a M200 plate reader (TECAN) until D₁₄, and for each individual we calculated the mean fluorescence of the three wells used as triplicates and of the two control wells (100% mortality). To determine the survival rates of cells from each individual, we compared these two mean fluorescence intensities and we converted the result to percentage of surviving cells. Finally, the survival rates of MtrBTN2 cells and hemocytes from healthy individuals were compared. The pH and osmolarity of the suspension were measured at T₀ and at the end of the experiment. The pH value at D₀ was 8.1 and decreased to a mean value of 7.9 (range 7.8–7.9) by D₁₄. The osmolarity at D₀ was 1151 mOsm/L and reached 1220 mOsm/L by the end of the experiment.

In order to verify whether hemocyte survival capacities in seawater could be species specific, we compared hemocytes' surviving capacities from different bivalve species. We performed the supplementary survival tests with hemocytes from 2 different bivalve species, *M. galloprovincialis* (phylogenetically very closed to *M. edulis* and *M. trossulus*) and *Crassostrea gigas*.

In vivo cell proliferation. We used the Click-iT EdU Cell Proliferation Kit for Imaging combined with Alexa Fluor 594 dye (invitrogen) to assess the proliferation capacities of MtrBTN2 cells and hemocytes. EdU is incorporated into newly synthesized DNA during cell multiplication. After anesthesia (T₀), we injected 200 μ L of a solution containing 75 μ g of EdU and filtered seawater into the posterior adductor muscle of four neoplastic mussels (advanced stage) and four healthy mussels. In addition, one healthy and one cancerous mussel were used as controls and injected with 200 μ L of sterile seawater. For the injection, we used a P200 pipette equipped with a 27G needle. EdU injected mussels and controls were then returned to individual tanks with aerated filtered seawater for 9 h. At T₉, we again anesthetized the EdU-treated and untreated mussels to draw 200 μ L of hemolymph from the adductor muscle. The 1 mL syringe was previously filled with 400 μ L of formalin to immediately fix the cells and avoid aggregation. After 10 min of incubation, we centrifuged the cellular suspension at 800 \times g for 10 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 1 mL of PBS + 1% BSA, centrifuged at 1200 \times g for 10 min at 4 °C,

and washed a second time. We then suspended the pellet in 1 mL of PBS + 0.1% Triton and incubated for 15 min. After incubation, cells were washed two times in PBS + 1% BSA and were ready for EdU detection according to the manufacturer's recommendations. Nuclei were counterstained in 1 mL of a Hoechst 33,342 (invitrogen) solution 1:2000 in PBS (final concentration 5 µg/mL), washed twice in PBS, and resuspended in 300 µL of PBS. We evaluated cell concentration on a Kova slide and diluted the suspension to a concentration of around 2×10^4 cell/mL to allow counting under an epifluorescence microscope (Axio Imager, ZEISS, 400X magnification) in the successive step. Next, 200 µL of this cell suspension were "cytospun" (Shandon Cytospin 4, Thermo SCIEN-TIFIC; 10 min, 800 rpm) on SuperFrost slides (Thermo SCIENTIFIC). The multiplication rate in 9 h (expressed as % of circulating cells having incorporated EdU in vivo 9 h after EDU injection) was determined for each individual, observing 10 fields, as the number of Alexa 594-labeled cells (cells that incorporated EdU in the last 9 h)/total number of cells. In addition to allow a count of total nuclei, Hoechst labeling permitted us to discriminate between neoplastic and normal cells according to nucleus size (the DNA content of cancerous cells is at least four times the normal diploid DNA content). We estimated the doubling time (dt) of MtrBTN2 cells. First, we calculated the rate of proliferation (k) according to the exponential growth formula: $k = \ln(y(t)) / t$, where t is the experimental time (9 h) and y is $1 + ((\text{mean \% of newly born MtrBTN2 cells}) / 100)$. The % of newly born cells is the number of cells having incorporated EdU in vivo 9 h/2. Then we calculated dt as $dt = \ln(2)/k$.

Reproductive condition. To assess the reproductive condition of individual mussels, gonadal follicle development and adipogranular (ADG) cell abundance were measured. We examined 16 neoplastic and 18 healthy mussels in various seasons: winter (late January, N=8), summer (mid-July, N=13), and late autumn (early December, N=13). All winter and autumn samples were at an advanced stage of the disease. Five summer samples were at an advanced stage while one was at an early stage and one at a medium stage. We fixed a transversal section of each individual in Davidson's solution for 48 h. These sections were then embedded in paraffin and 3 µM sections were made. Finally, we processed the sections with hematoxylin and eosin staining. We examined tissue sections at X100 and X200 and defined gonadal developmental stages according to Lubet⁵⁶ but modified as follows: stage 0: resting, reconstitution of the energy reserves in connective tissue ADG cells; stage 1, gonia proliferation; stage 2: all developmental stages present with only a few mature gametes; stage 3: for simplification, we grouped Lubet's stages 3A, 3B, and 3C together, having a predominance of mature gametes, low energy reserves, and no or few ADG; stage 4: resorption stage corresponding to Lubet's stage 3D. This classification allowed us to compare the seasonality we observed with the seasonality described in the study of Randriananja³⁰ conducted in Pertuis-Breton (Pays de la Loire, Atlantic coast of France). To our knowledge, no data are available for our study area. The sampling sites of both studies are shown in Supplementary Fig. S3. Note that the mussels grown in Agon-Coutainville are initially collected in the Atlantic Coast and are thus descendants of mussels genetically similar to mussels of Pertuis-Breton⁵⁷.

Statistical analysis. Differences between cancerous and normal cells in terms of survival rate were tested with a Mann–Whitney test performed on the individual daily results of the three wells of the three independent experiments. A Mann–Whitney test was also carried out on proliferation results comparing cancerous cells and hemocytes. For these analyses, the threshold significance level was set at 0.05.

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its Supplementary Information files.

Received: 4 September 2021; Accepted: 3 December 2021

Published online: 16 December 2021

References

1. Aktipis, A. *The Cheating Cell: How Evolution Helps Us Understand and Treat Cancer* (Princeton University Press, 2020).
2. Martinez-Outschoorn, U. E. *et al.* Stromal–epithelial metabolic coupling in cancer: integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment. *Int. J. Biochem. Cell. B.* **43**(7), 1045–1051. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.01.023> (2011).
3. Ujvari, B. *et al.* Cancer and life-history traits: lessons from host-parasite interactions. *Parasitology* **143**, 533–541. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000147> (2016).
4. Overstreet, R. M. & Lotz, J. M. Host-symbiont relationships: understanding the change from guest to pest. In *The Rasputin Effect: Why Commensals and Symbionts Become Parasitic. Advances in Environmental Microbiology* (ed. Hurst, C.) (Springer, Cham, 2016). https://doi.org/10.1007/978-3-319-28170-4_2.
5. Combes, C. *Parasitism: The Ecology and Evolution of Intimate Inter-actions* (University of Chicago Press, 2001).
6. Dujon, A. M. *et al.* Transmissible cancers in an evolutionary Perspective. *iScience* **23**(7), 101269. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101269> (2020).
7. Murgia, C., Pritchard, J. K., Kim, S. Y., Fassati, A. & Weiss, R. A. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell* **126**(3), 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.051> (2006).
8. Rebbeck, C. A., Thomas, R., Breen, M., Leroi, A. M. & Burt, A. Origins and evolution of a transmissible cancer. *Evolution* **63**(9), 2340–2349. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00724.x> (2009).
9. Pearse, A. M. & Swift, K. Allograft theory: transmission of devil facial-tumor disease. *Nature* **439**(7076), 549. <https://doi.org/10.1038/439549a> (2006).
10. Pye, R. J. *et al.* A second transmissible cancer in Tasmanian devils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**(2), 374–379. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519691113> (2016).
11. Metzger, M. J., Reinisch, C., Sherry, J. & Goff, S. P. Horizontal transmission of clonal cancer cells causes leukemia in soft-shell clams. *Cell* **161**(2), 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.042> (2015).
12. Metzger, M. J. *et al.* Widespread transmission of independent cancer lineages within multiple bivalve species. *Nature* **534**(7609), 705–709. <https://doi.org/10.1038/nature18599> (2016).

13. Yonemitsu, M. A. *et al.* A single clonal lineage of transmissible cancer identified in two marine mussel species in South America and Europe. *ELife* **8**, 1029. <https://doi.org/10.7554/eLife.47788> (2019).
14. Garcia-Souto, D. *et al.* Mitochondrial genome sequencing of marine leukemias reveals cancer contagion between clam species in the Seas of Southern Europe. *BioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.03.10.434714> (2021).
15. Hammel, M. *et al.* Prevalence and polymorphism of a mussel transmissible cancer in Europe. *Mol. Ecol.* **2**, 1–16. <https://doi.org/10.1111/mec.16052> (2021).
16. Skazina, M. *et al.* First description of a widespread *Mytilus trossulus*-derived bivalve transmissible cancer lineage in *M. trossulus* itself. *Sci. Rep.* **11**(5809), 56930 (2021).
17. Burioli, E. A. V. *et al.* Implementation of various approaches to study the prevalence, incidence and progression of disseminated neoplasia in mussel stocks. *J. Invertebr. Pathol.* **168**, 107271. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107271> (2019).
18. Murray, M., James, Z. H. & Martin, W. B. A study of the cytology and karyotype of the canine transmissible venereal tumour. *Res. Vet. Sci.* **10**(6), 565–572. [https://doi.org/10.1016/50034-5288\(18\)34394-7](https://doi.org/10.1016/50034-5288(18)34394-7) (1969).
19. Hamede, R. K., McCallum, H. & Jones, M. Biting injuries and transmission of Tasmanian devil facial tumour disease. *J. Anim. Ecol.* **82**(1), 182–190 (2013).
20. Sunila, I. & Farley, C. Environmental limits for survival of sarcoma cells from the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Dis. Aquat. Organ.* **7**, 111–115. <https://doi.org/10.3354/dao007111> (1989).
21. Carballal, M. J., Barber, B. J., Iglesias, D. & Villalba, A. Neoplastic diseases of marine bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* **131**, 83–106. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.004> (2015).
22. Carella, F., Figueras, A., Novoa, B. & De Vico, G. Cytomorphology and PCNA expression pattern in bivalves *Mytilus galloprovincialis* and *Cerastoderma edule* with haemic neoplasia. *Dis. Aquat. Org.* **105**, 81–87. <https://doi.org/10.3354/dao02612> (2013).
23. Baudoin, M. Host castration as a parasitic strategy. *Evolution* **29**, 335–352. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1975.tb00213.x> (1975).
24. Alderman, D. J., Van Banning, P. & Perez-Colomer, A. Two abnormal European oyster (*Ostrea edulis*) mortalities associated with an abnormal haemocytic condition. *Aquaculture* **10**(4), 335–340. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(77\)90124-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(77)90124-7) (1977).
25. Cosson-Mannevy, M. A., Wong, C. S. & Cretney, W. J. Putative neoplastic disorders in mussels (*Mytilus edulis*) from southern Vancouver Island waters, British Columbia. *J. Invertebr. Pathol.* **44**(2), 151–160. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(84\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(84)90006-5) (1984).
26. Brousseau, D. J. Seasonal aspects of sarcomatous neoplasia in *Mya arenaria* (soft-shell clam) from Long Island Sound. *J. Invertebr. Pathol.* **50**(3), 269–276. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(87\)90092-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(87)90092-9) (1987).
27. Peters, E. C. Recent investigations on the disseminated sarcomas of marine bivalve molluscs. In: W. S. Fisher, editor. Diseases processes in marine bivalve mollusc. Washington, DC: special publication No. 18, American Fisheries Society. pp. 74–92 (1988).
28. Ford, S. E., Barber, B. J. & Marks, E. Disseminated neoplasia in juvenile Eastern oyster *Crassostrea virginica*, and its relationship to the reproductive cycle. *Dis. Aquat. Org.* **28**, 73–77. <https://doi.org/10.3354/dao028073> (1997).
29. Barber, B. J. Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. *Aquat. Living Resour.* **17**, 449–466. <https://doi.org/10.1051/alr:2004052> (2004).
30. Randriananja, G. Evolution de la maturation de *Mytilus edulis* sur deux sites d'élevage du pertuis Breton : bouchots et filières. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00446/55762/57424.pdf> (2006).
31. Levitan, D. R. Sperm limitation, gamete competition and sexual selection in external fertilizers (eds. Birkhead, T. R., Moller, A. P.) 175–217. Sperm competition and sexual selection (Academic Press, 1998).
32. Arzul, I. *et al.* Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Organ.* **85**, 67–75. <https://doi.org/10.3354/dao02047> (2009).
33. Greaves, M. & Maley, C. C. Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**(7381), 306–313. <https://doi.org/10.1038/nature10762> (2012).
34. Scott, J. & Marusyk, A. Somatic clonal evolution: a selection-centric perspective. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **1867**(2), 139–150 (2017).
35. Moore, M. N. & Lowe, D. M. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their response to experimentally injected carbon particles. *J. Invertebr. Pathol.* **29**, 18–30. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(77\)90167-7](https://doi.org/10.1016/0022-2011(77)90167-7) (1977).
36. Rasmussen, L. P. D., Hage, E. & Karlog, O. An electron microscope study of the circulating leucocytes of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *J. Invertebr. Pathol.* **45**, 158–167. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(85\)90005-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(85)90005-9) (1985).
37. Carballal, M. J., López, M. C., Azevedo, C. & Villalba, A. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.* **29**, 127–135. <https://doi.org/10.3354/dao029127> (1997).
38. Frei, E. 3rd. & Freireich, E. J. Progress and perspectives in the chemotherapy of acute leukemia. *Adv. Chemother.* **2**, 269–298. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4831-9930-6.50011-3> (1965).
39. Ellison, R. R. & Murphy, M. L. "Apparent doubling time" of leukemic cells in marrow. *Clin. Res.* **12**, 284 (1964).
40. Hirt, A., Schmid, A. M., Ammann, R. & Leibungut, K. In pediatric lymphoblastic leukemia of B-Cell origin, a small population of primitive blast cells is noncycling, suggesting them to be leukemia stem cell candidates. *Pediatr. Res.* **69**, 194–199. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3182092716> (2011).
41. Shimomatsuya, T., Tanigawa, N. & Muraoka, R. Proliferative activity of human tumors: assessment using bromodeoxyuridine and flow cytometry. *Jpn. J. Cancer Res.* **82**(3), 357–362. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1991.tb01854.x> (1991).
42. Ford, S., Schotthofer, A. & Spruck, C. In vivo dynamics of the microparasite *Perkinsus marinus* during progression and regression of infections in Eastern oysters. *J. Parasitol.* **85**(2), 273–282. <https://doi.org/10.2307/3285632> (1999).
43. Caza, F., Bernet, E., Veyrier, E. J., Betoulle, S. & St-Pierre, Y. Hemocytes released in seawater act as Trojan horses for spreading of bacterial infections in mussels. *Sci. Rep.* **10**, 19696 (2020).
44. McCallum, H. I. *et al.* Does terrestrial epidemiology apply to marine systems? *Trends Ecol. Evol.* **19**(11), 585–591. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.08.009> (2004).
45. Ewald, P. W. Evolutionary biology and the treatment of signs and symptoms of infectious disease. *J. Theor. Biol.* **86**(1), 169–176. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(80\)90073-9](https://doi.org/10.1016/0022-5193(80)90073-9) (1980).
46. Poulin, R. Chapter 5-Parasite Manipulation of Host Behavior: An Update and Frequently Asked Questions (eds: Brockmann, H. J., Roper, T. J., Naguib, M., Wynne-Edwards, K. E., Mitani, J. C., Simmons, L. W.). *Advances in the Study of Behavior*, Academic Press **41**, 151–186. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(10\)41005-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(10)41005-0) (2010).
47. Cremonese, F., Vázquez, N. & Silva, M. R. Gonad atrophy caused by disseminated neoplasia in *Mytilus chilensis* cultured in the Beagle Channel, Tierra Del Fuego Province, Argentina. *J. Shellfish Res.* **30**, 845–849. <https://doi.org/10.2983/035.030.0325> (2011).
48. Tissot, T. *et al.* Host manipulation by cancer cells: expectations, facts, and therapeutic implications. *BioEssays* **38**(3), 276–285. <https://doi.org/10.1002/bies.201500163> (2016).
49. Thomas, F., Guégan, J. F., Michalakakis, Y. & Renaud, F. Parasites and host life-history traits: implications for community ecology and species co-existence. *Int. J. Parasitol.* **30**(5), 669–674. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00040-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00040-0) (2000).
50. Charles, M. Etude des pathogènes, des conditions physiologiques et pathologiques impliqués dans les mortalités anormales de moules (*Mytilus* sp.). Biologie animale. Normandie Université. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-0.053331> (2019).
51. Anderson, R. M. & May, R. M. Population biology of infectious diseases: part I. *Nature* **280**, 361–367. <https://doi.org/10.1038/280361a0> (1979).
52. Kuris, A. M. Trophic interactions: similarity of parasitic castrators to parasitoids. *Q. Rev. Biol.* **49**, 129–148 (1974).

53. Faure, M. F., David, P., Bonhomme, F. & Bierne, N. Genetic hitchhiking in a subdivided population of *Mytilus edulis*. *BMC Evol. Biol.* **8**, 164. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-164> (2008).
54. Bierne, N. The distinctive footprints of local hitchhiking in a varied environment and global hitchhiking in a subdivided population. *Evolution* **64**(11), 3254–3272. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.01050.x> (2010).
55. Suquet, M. *et al.* Anesthesia in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* **22**, 29–34. <https://doi.org/10.1051/alr/2009006> (2009).
56. Lubet, P. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés. *Rev Trav Inst Pêches marit.* **23**(4), 390–548 (1959).
57. Bierne, N. *et al.* Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M galloprovincialis*. *Mol. Ecol.* **12**(2), 447–61. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2003.01730.x> (2003).

Acknowledgements

We thank Benoit Clouet, the mussel farmer that was an indispensable partner of the study. We thank the Animal Health-Clinical Biology unit of the LABÉO laboratory (Caen, France) and especially Sylvie Dumontier and Ludovic Petit for their hospitality and technical support. We acknowledge the imaging facility "MRI", member of the national infrastructure France - BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, «Investments for the future») and the "Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier" - RHEM facility - supported by SIRIC Montpellier Cancer (Grant INCa_Inserm_DGOS_12553), the European regional development foundation and the Occitanian region (FEDER-FSE 2014-2020 Languedoc Roussillon), for processing our animal tissues, histology techniques and expertise. This work was supported by the French National Agency for Research, TRANCAN project (ANR-18-CE35-0009) and the Montpellier Université d'Excellence (MUSE), BLUECANCER project. FT is supported by the MAVA Foundation. This study is set within the framework of the 'Laboratoires d'Excellence (LABEX)' Tulip (ANR- 10-LABX-41).

Author contributions

C.G.M., B.E.A.V. designed the study. C.G.M., B.N., Ha.M., B.E.A.V. developed methodologies. B.E.A.V., Ha.M., Ho.M provided biological resources and carried out investigations. B.E.A.V., C.G.M., B.N., Ha.M, D-G.D., T.F. interpreted the data. T.F., D-G.D. were in charge of the project administration. B.E.A.V. wrote the main manuscript text and prepared the figures. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03598-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to E.A.V.B.

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

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



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

© The Author(s) 2021

--- Références Bibliographiques ---

- Aanen, D. K., Spelbrink, J. N., & Beekman, M. (2014). What cost mitochondria? The maintenance of functional mitochondrial DNA within and across generations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1646). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2013.0438>
- Abdullayeva, L. (2020). Donor-Transmitted Melanoma: Is It Still Bothering Us? *Current Treatment Options in Oncology*, 21(5). <https://doi.org/10.1007/s11864-020-00740-0>
- AboElkhair, M., Iwamoto, T., Clark, K. F., McKenna, P., Siah, A., Greenwood, S. J., ... Cepica, A. (2012). Lack of detection of a putative retrovirus associated with haemic neoplasia in the soft shell clam *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1), 97–104. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2011.10.008>
- AboElkhair, M., Synard, S., Siah, A., Pariseau, J., Davidson, J., Johnson, G., ... Cepica, A. (2009). Reverse transcriptase activity in tissues of the soft shell clam *Mya arenaria* affected with haemic neoplasia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(2), 133–140. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2009.06.009>
- Adema, C. M. (2015). Fibrinogen-related proteins (Freps) in mollusks. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 57, 111–129. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20819-0_5
- Aktipis, C. A., Boddy, A. M., Jansen, G., Hibner, U., Hochberg, M. E., Maley, C. C., & Wilkinson, G. S. (2015). Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 370(20140219). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0219>
- Aktipis, C. A., & Nesse, R. M. (2012). Evolutionary foundations for cancer biology. <https://doi.org/10.1111/eva.12034>
- Albuquerque, T. A. F., Val, L. D. do, Doherty, A., & Magalhães, J. P. de. (2018). From humans to hydra: patterns of cancer across the tree of life. *Biological Reviews*, 93(3), 1715–1734. <https://doi.org/10.1111/BRV.12415>
- Alderman, D. J., Van Banning, P., & Perez-Colomer, A. (1977). Two European oyster (*Ostrea edulis*) mortalities associated with an abnormal haemocytic condition. *Aquaculture*, 10(4), 335–340. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(77\)90124-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(77)90124-7)
- Allam, B., Carden, W. E., Ward, J. E., Ralph, G., Winnicki, S., & Pales Espinosa, E. (2013). Early host-pathogen interactions in marine bivalves: Evidence that the alveolate parasite *Perkinsus marinus* infects through the oyster mantle during rejection of pseudofeces. *Journal of Invertebrate Pathology*, 113(1), 26–34. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2012.12.011>
- Allam, B., Paillard, C., & Ford, S. E. (2002). Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48(3), 221–231. <https://doi.org/10.3354/DAO048221>
- Allam, B., & Pales Espinosa, E. (2016). Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place? *Fish & Shellfish Immunology*, 53, 4–12. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2016.03.037>
- Allam, B., & Raftos, D. (2015). Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 121–136. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2015.05.005>
- Amend, S. R., Torga, G., Lin, K. C., KostECKa, L. G., de Marzo, A., Austin, R. H., & Pienta, K. J. (2019, September 1). Polyploid giant cancer cells: Unrecognized actuators of tumorigenesis, metastasis,

- and resistance. *Prostate*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/pros.23877>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, *31*(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU638>
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online.
- Arakawa, A., Ichikawa, H., Kubo, T., Motoi, N., Kumamoto, T., Nakajima, M., ... Ogawa, C. (2021). Vaginal Transmission of Cancer from Mothers with Cervical Cancer to Infants. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2030391>, *384*(1), 42–50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2030391>
- Arnal, A., Jacqueline, C., Ujvari, B., Leger, L., Moreno, C., Faugère, D., ... Frédéric, T. (2017). Cancer brings forward oviposition in the fly *Drosophila melanogaster*. *Biology Letters Submitted*, (September 2016), 272–276. <https://doi.org/10.1002/ece3.2571>
- Arriagada, G., Metzger, M. J., Muttray, A. F., Sherry, J., Reinisch, C., Street, C., ... Goff, S. P. (2014). Activation of transcription and retrotransposition of a novel retroelement, Steamer, in neoplastic hemocytes of the mollusk *Mya arenaria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(39), 14175–14180. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409945111>
- Ashbel, R. (1945). Spontaneous transmissible tumours in the Syrian hamster [7]. *Nature*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/155607b0>
- Ashley, D. J. (1969). The two “hit” and multiple “hit” theories of carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, *23*(2), 313. <https://doi.org/10.1038/BJC.1969.41>
- Atreya, C. E., Collisson, E. A., Park, M., Grenert, J. P., Behr, S. C., Gonzalez, A., ... Chin-Hong, P. (2020). Molecular Insights in Transmission of Cancer From an Organ Donor to Four Transplant Recipients. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, *18*(11), 1446–1452. <https://doi.org/10.6004/JNCCN.2020.7622>
- Baez-Ortega, A., Gori, K., Strakova, A., Allen, J. L., Allum, K. M., Banske-Issa, L., ... Murchison, E. P. (2019). Somatic evolution and global expansion of an ancient transmissible cancer lineage. *Science*, *365*(6452). <https://doi.org/10.1126/science.aau9923>
- Bai, Y., Niu, D., Li, Y., Bai, Y., Lan, T., Peng, M., ... Li, J. (2019). Identification and characterisation of a novel small galectin in razor clam (*Sinonovacula constricta*) with multiple innate immune functions. *Developmental & Comparative Immunology*, *93*, 11–17. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2018.10.015>
- Baines, C., Lerebours, A., Thomas, F., Fort, J., Kreitsberg, R., Gentes, S., ... Sepp, T. (2021). Linking pollution and cancer in aquatic environments: A review. *Environment International*, *149*, 106391. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2021.106391>
- Banfield, W. G., Woke, P. A., Mackay, C. M., & Cooper, H. L. (1965). Mosquito transmission of a reticulum cell sarcoma of hamsters. *Science*, *148*(3674), 1239–1240. <https://doi.org/10.1126/science.148.3674.1239>
- Barber, B. J. (2004). Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. *Aquatic Living Resources*, *17*(4), 449–466. <https://doi.org/10.1051/alr:2004052>

- Benabdelmouna, A., & Ledu, C. (2016). The mass mortality of blue mussels (*Mytilus* spp.) from the Atlantic coast of France is associated with heavy genomic abnormalities as evidenced by flow cytometry. *Journal of Invertebrate Pathology*, *138*, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.06.001>
- Bielby, J., Price, S. J., Monsalve-Carcaño, C., & Bosch, J. (2021). Host contribution to parasite persistence is consistent between parasites and over time, but varies spatially. *Ecological Applications*, *31*(3), e02256. <https://doi.org/10.1002/EAP.2256>
- Bierne, N., Borsa, P., Daguin, C., Jollivet, D., Viard, F., Bonhomme, F., & David, P. (2003). Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Molecular Ecology*, *12*(2), 447–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01730.x>
- Bierne, Nicolas, Bonhomme, F., & David, P. (2003). Habitat preference and the marine-speciation paradox. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1522), 1399–1406. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2003.2404>
- Bierne, Nicolas, David, P., Langlade, A., & Bonhomme, F. (2002). Can habitat specialisation maintain a mosaic hybrid zone in marine bivalves? *Marine Ecology Progress Series*, *245*, 157–170. <https://doi.org/10.3354/MEPS245157>
- Bommarito, C., Thielges, D. W., Pansch, C., Barboza, F. R., Pranovi, F., & Wahl, M. (2021). Effects of first intermediate host density, host size and salinity on trematode infections in mussels of the southwestern Baltic Sea. *Parasitology*, *148*(4), 486–494. <https://doi.org/10.1017/S0031182020002188>
- Bos, J. L. (1989). ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Research*, *49*(17).
- Böttger, S. A., Amarosa, E. J., Geoghegan, P., & Walker, C. W. (2013). Chronic Natural Occurrence of Disseminated Neoplasia in Select Populations of the Soft-Shell Clam, *Mya arenaria*, in New England. <https://doi.org/10.1656/045.020.0308>, *20*(3), 430–440. <https://doi.org/10.1656/045.020.0308>
- Bouallegui, Y. (2019). Immunity in mussels: An overview of molecular components and mechanisms with a focus on the functional defenses. *Fish & Shellfish Immunology*, *89*, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.057>
- Boutry, J., Dujon, A. M., Gerard, A.-L., Tissot, S., Macdonald, N., Schultz, A., ... Thomas, F. (2020). Ecological and Evolutionary Consequences of Anticancer Adaptations. *iScience*, *23*(11). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101716>
- Brindley, D., & Banfield, W. G. (1961). A Contagious Tumor of the Hamster. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *26*(4), 949–957. <https://doi.org/10.1093/jnci/26.4.949>
- Brousseau, D. J., & Baglivo, J. A. (1991). Field and laboratory comparisons of mortality in normal and neoplastic *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *57*(1), 59–65. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90041-N](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90041-N)
- Brown, J. S., & Aktipis, C. A. (2015). Inclusive fitness effects can select for cancer suppression into old age. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1673). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2015.0160>
- Brüniche-Olsen, A., Jones, M. E., Austin, J. J., BurrIDGE, C. P., & Holland, B. R. (2014). Extensive population

- decline in the Tasmanian devil predates European settlement and devil facial tumour disease. *Biology Letters*, 10(11). <https://doi.org/10.1098/RSBL.2014.0619>
- Burioli, E. A. V., Trancart, S., Simon, A., Bernard, I., Charles, M., Oden, E., ... Houssin, M. (2019). Implementation of various approaches to study the prevalence, incidence and progression of disseminated neoplasia in mussel stocks. *Journal of Invertebrate Pathology*, 168(April), 107271. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107271>
- Burnet, F. M. (1971). Immunological Surveillance in Neoplasia. *Immunological Reviews*, 7(1), 3–25. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.1971.TB00461.X>
- Buss, L. W. (1987). *The Evolution of Individuality*. Princeton University Press.
- Cairns, J. (1975). Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 1975 255:5505, 255(5505), 197–200. <https://doi.org/10.1038/255197a0>
- Campalans, M., Gonzalez, M., & Rojas, P. (Escuela de C. del M. U. C. de V. C. 1020, V. (Chile)). (1998). Neoplasia in *Mytilus chilensis* cultivated in Chiloe Island (Chile). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (United Kingdom)*. Retrieved from <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB1997047632>
- Canesi, L., Ciacci, C., Bergami, E., Monopoli, M. P., Dawson, K. A., Papa, S., ... Corsi, I. (2015). Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Marine Environmental Research*, 111, 34–40. <https://doi.org/10.1016/J.MARENRES.2015.06.008>
- Carballal, M. J., Barber, B. J., Iglesias, D., & Villalba, A. (2015). Neoplastic diseases of marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 83–106. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2015.06.004>
- Carballal, M. J., Carmen López, M., Azevedo, C., & Villalba, A. (1997). Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Disease of Aquatic Organisms*, 29(2), 127–135. <https://doi.org/10.3354/DAO029127>
- Carballal, M. J., Iglesias, D., Díaz, S., & Villalba, A. (2013). Disseminated neoplasia in clams *Venerupis aurea* from Galicia (NW Spain): Histopathology, ultrastructure and ploidy of the neoplastic cells, and comparison of diagnostic procedures. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112(1), 16–19. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2012.10.003>
- Carballal, M. J., Iglesias, D., Santamarina, J., Ferro-Soto, B., & Villalba, A. (2001). Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the coast of Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(2), 87–97. <https://doi.org/10.1006/JIPA.2001.5049>
- Carella, F., Feist, S. W., Bignell, J. P., & De Vico, G. (2015). Comparative pathology in bivalves: Aetiological agents and disease processes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 107–120. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2015.07.012>
- Carella, F., Figueras, A., Novoa, B., & De Vico, G. (2013). Cytomorphology and PCNA expression pattern in bivalves *Mytilus galloprovincialis* and *Cerastoderma edule* with haemic neoplasia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1), 81–87. <https://doi.org/10.3354/dao02612>
- Carrasco, N., Arzul, I., Berthe, F., Fernández-Tejedor, M., Durfort, M., & Furones, M. (2008). Delta de

- l’Ebre is a natural bay model for *Marteilia* spp. (Paramyxea) dynamics and life-cycle studies. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79(1), 65–73. <https://doi.org/10.3354/dao01844>
- Caulin, A. F., & Maley, C. C. (2011). Peto’s Paradox: evolution’s prescription for cancer prevention. *Trends Ecol. Evol.*, 26, 175–182.
- Caza, F., E, B., FJ, V., S, B., & Y, S.-P. (2020). Hemocytes released in seawater act as Trojan horses for spreading of bacterial infections in mussels. *Scientific Reports*, 10(1), 19696–19696. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-76677-Z>
- Charles, M. (2019). Etude des pathogènes, des conditions physiologiques et pathologiques impliqués dans les mortalités anormales de moules (*Mytilus* sp.). Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03053331>
- Charles, M., Bernard, I., Villalba, A., Oden, E., Burioli, E. A. V., Allain, G., ... Houssin, M. (2020). High mortality of mussels in northern Brittany – Evaluation of the involvement of pathogens, pathological conditions and pollutants. *Journal of Invertebrate Pathology*, 170, 107308. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107308>
- Chouaib, S., Messai, Y., Couve, S., Escudier, B., Hasmim, M., & Noman, M. Z. (2012). Hypoxia Promotes Tumor Growth in Linking Angiogenesis to Immune Escape. *Frontiers in Immunology*, 0(FEB), 21. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2012.00021>
- Christensen, D. J., Farley, C. A., & Kern, F. G. (1974). Epizootic Neoplasms in the Clam *Macoma balthica* (L.) From Chesapeake Bay. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 52(6), 1739–1749. <https://doi.org/10.1093/JNCI/52.6.1739>
- Ciocan, C. M., Moore, J. D., & Rotchell, J. M. (2006). The role of ras gene in the development of haemic neoplasia in *Mytilus trossulus*. *Marine Environmental Research*, 62(SUPPL. 1), S147–S150. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.04.020>
- Ciocan, CM, & Rotchell, J. M. (2005). Conservation of Cancer Genes in the Marine Invertebrate *Mytilus edulis*. *Environmental Science and Technology*, 39(9), 3029–3033. <https://doi.org/10.1021/ES0400887>
- Ciocan, Corina, & Sunila, I. (2005). Disseminated neoplasia in blue mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from the Black Sea, Romania. *Marine Pollution Bulletin*, 50(11), 1335–1339. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.04.042>
- Collins, C. M., & Mulcahy, M. F. (2003). Cell-free transmission of a haemic neoplasm in the cockle *Cerastoderma edule*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 54(1), 61–67. <https://doi.org/10.3354/DAO054061>
- Cooper, H. L., Mackay, C. M., & Banfield, W. G. (1964). Chromosome Studies of a Contagious Reticulum Cell Sarcoma of the Syrian Hamster. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 33(4), 691–706. <https://doi.org/10.1093/JNCI/33.4.691>
- Cooper, K. R., Brown, R. S., & Chang, P. W. (1982). The course and mortality of a hematopoietic neoplasm in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 39(2), 149–157. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(82\)90004-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(82)90004-0)

- Corthay, A. (2014). Does the Immune System Naturally Protect Against Cancer? *Frontiers in Immunology*, 0(MAY), 197. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00197>
- Côté, I. M., & Jelnikar, E. (1999). Predator-induced clumping behaviour in mussels (*Mytilus edulis* Linnaeus). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 235(2), 201–211. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(98\)00155-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00155-5)
- Coustau, C., Gourbal, B., Duval, D., Yoshino, T. P., Adema, C. M., & Mitta, G. (2015). Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(1), 5–16. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2015.01.036>
- Coustau, C., Renaud, F., & Delay, B. (1991). Genetic characterization of the hybridization between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on the Atlantic coast of France. *Marine Biology*, 111(1), 87–93. <https://doi.org/10.1007/BF01986350>
- Cremonte, F., Puebla, C., Tillería, J., & Videla, & Viviana. (2015). Histopathological survey of *Mytilus chilensis* and *Gari solida* Histopathological survey of the mussel *Mytilus chilensis* (Mytilidae) and the clam *Gari solida* (Psammobiidae) from southern Chile. *Lat. Am. J. Aquat. Res*, 43(1), 248–254. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue1-fulltext-21>
- Cremonte, F., Vázquez, N., & Silva, M. R. (2011). Gonad Atrophy Caused by Disseminated Neoplasia in *Mytilus chilensis* Cultured in the Beagle Channel, Tierra Del Fuego Province, Argentina. *Journal of Shellfish Research*, 30(3), 845–849. <https://doi.org/10.2983/035.030.0325>
- da Silva, P. Mirella, Fuentes, J., & Villalba, A. (2005). Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on-growing in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). *Marine Biology* 2005 147:4, 147(4), 965–977. <https://doi.org/10.1007/S00227-005-1627-4>
- Da Silva, Patricia Mirella, Fuentes, J., & Villalba, A. (2011). Disseminated neoplasia in flat oysters *Ostrea edulis* from Galicia (NW Spain): Occurrence, ultrastructural aspects and relationship with bonamiosis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107(1), 50–59. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2011.01.001>
- Daguin, C., Bonhomme, F., & Borsa, P. (2001). The zone of sympatry and hybridization of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*, as described by intron length polymorphism at locus mac-1. *Heredity* 2001 86:3, 86(3), 342–354. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00832.x>
- Dairain, A., Engelsma, M. Y., Drent, J., Dekker, R., & Thieltges, D. W. (2020). High prevalences of disseminated neoplasia in the Baltic tellin *Limecola balthica* in the Wadden Sea. *Diseases of Aquatic Organisms*, 138, 89–96. <https://doi.org/10.3354/dao03448>
- Dalton-Griffin, L., & Kellam, P. (2009). Infectious causes of cancer and their detection. *Journal of Biology* 2009 8:7, 8(7), 1–5. <https://doi.org/10.1186/JBIOL168>
- De Coster, S., Koppen, G., Bracke, M., Schroyen, C., Den Hond, E., Nelen, V., ... van Larebeke, N. (2008). Pollutant effects on genotoxic parameters and tumor-associated protein levels in adults: a cross sectional study. *Environmental Health* 2008 7:1, 7(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-7-26>

- De Gruijl, F. R. (1999). Skin cancer and solar UV radiation. *European Journal of Cancer*, 35(14), 2003–2009. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(99\)00283-X](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(99)00283-X)
- DeGregori, J. (2011). Evolved Tumor Suppression: Why Are We So Good at Not Getting Cancer? *Cancer Research*, 71(11), 3739–3744. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0342>
- Díaz, S., Villalba, A., Insua, A., Soudant, P., Fernández-Tajes, J., Méndez, J., & Carballal, M. J. (2013). Disseminated neoplasia causes changes in ploidy and apoptosis frequency in cockles *Cerastoderma edule*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 113(3), 214–219. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2013.03.010>
- Díaz, Seila, Renault, T., Villalba, A., & Carballal, M. J. (2011). Disseminated neoplasia in cockles *Cerastoderma edule*: ultrastructural characterisation and effects on haemolymph cell parameters. *Diseases of Aquatic Organisms*, 96(2), 157–167. <https://doi.org/10.3354/DAO02384>
- Dishaw, L. J., & Litman, G. W. (2009). Invertebrate Allorecognition: The Origins of Histocompatibility. *Current Biology*, 19(7), R286–R288. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.035>
- Dobin, A., Davis, C., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., ... Gingeras, T. . (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTS635>
- Dodueva, I. E., Lebedeva, M. A., Kuznetsova, K. A., Gancheva, M. S., Paponova, S. S., & Lutova, L. L. (2020). Plant tumors: a hundred years of study. *Planta 2020 251:4*, 251(4), 1–28. <https://doi.org/10.1007/S00425-020-03375-5>
- Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K. S., & Soudant, P. (2009). Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. *Aquaculture*, 297(1–4), 10–24. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2009.09.003>
- Dove, A. D. M., Bowser, P. R., & Cerrato, R. M. (2004). Histological Analysis of an Outbreak of QPX Disease in Wild Hard Clams *Mercenaria mercenaria* in New York. *Journal of Aquatic Animal Health*, 16(4), 246–250. <https://doi.org/10.1577/H03-052.1>
- Dumbravă, M. D., Rothschild, B. M., Weishampel, D. B., Csiki-Sava, Z., Andrei, R. A., Acheson, K. A., & Codrea, V. A. (2016). A dinosaurian facial deformity and the first occurrence of ameloblastoma in the fossil record. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP29271>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology 2002 3:11*, 3(11), 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Eggermont, M., Cornillie, P., Dierick, M., Adriaens, D., Nevejan, N., Bossier, P., ... Declercq, A. M. (2020). The blue mussel inside: 3D visualization and description of the vascular-related anatomy of *Mytilus edulis* to unravel hemolymph extraction. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62933-9>
- El Ayari, T., Trigui El Menif, N., Hamer, B., Cahill, A. E., & Bierne, N. (2019). The hidden side of a major marine biogeographic boundary: a wide mosaic hybrid zone at the Atlantic–Mediterranean divide reveals the complex interaction between natural and genetic barriers in mussels. *Heredity 2019 122:6*, 122(6), 770–784. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0174-y>

- Elston, R. A., Kent, M. L., & Drum, A. S. (1988a). *Progression, lethality and remission of hemic neoplasia in the bay mussel Mytilus edulis* (Vol. 4). Retrieved from <https://www.int-res.com/articles/dao/4/d004p135.pdf>
- Elston, R. A., Kent, M. L., & Drum, A. S. (1988b). Transmission of hemic neoplasia in the bay mussel, *Mytilus edulis*, using whole cells and cell homogenate. *Developmental and Comparative Immunology*, 12(4), 719–727. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(88\)90047-X](https://doi.org/10.1016/0145-305X(88)90047-X)
- Elston, R. A., Moore, J. D., & Brooks, K. (1992). Disseminated neoplasia of bivalve molluscs. *Rev. Aquat. Sci.*, 6(5–6), 405–466. Retrieved from <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0001141213&origin=inward&txGid=1704476f390ea78657746d8485ae4e7e>
- Escoubas, J. M., Gourbal, B., Duval, D., Green, T., Charrière, G. M., Destoumieux-Garzón, D., & Montagnani, C. (2016). Immunity in molluscs. In *Encyclopedia of Immunobiology* (pp. 417–429).
- Euler, H. A. (2011). Grandparents and Extended Kin. In C. Salmon, T. Shackelford, & C. Shackelford (Eds.), *The Oxford handbook of evolutionary family psychology* (Oxford Uni, pp. 181–207).
- Fabrizio, A. M. (1965). An Induced Transmissible Sarcoma in Hamsters: Eleven-Year Observation through 288 Passages. *Cancer Research*, 25(2 Part 1).
- Farley, C. A. (1969a). Probable neoplastic disease of the hematopoietic system in oysters, *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. *Natl. Cancer L. Monogr.*, 31, 541–555.
- Farley, C. A. (1969b). Sarcomatoid proliferative disease in a wild population of blue mussels (*mytilus edulis*). *Journal of the National Cancer Institute*, 43(2), 509–516. <https://doi.org/10.1093/jnci/43.2.509>
- Farley, C Austin, Plutschak, D. L., & Scott, R. F. (1991). *Epizootiology and Distribution of Transmissible Sarcoma in Maryland Softshell Clams, Mya arenaria, 1984-1988. Environmental Health Perspectives* (Vol. 90).
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I)
- Feis, M. E., John, U., Lokmer, A., Luttikhuisen, P. C., & Wegner, K. M. (2018). Dual transcriptomics reveals co-evolutionary mechanisms of intestinal parasite infections in blue mussels *Mytilus edulis*. *Molecular Ecology*, 27(6), 1505–1519. <https://doi.org/10.1111/mec.14541>
- Figueras, A. J., Jardon, C. F., & Caldas, J. R. (1991a). Diseases and parasites of mussels (*Mytilus edulis* Linnaeus, 1758) from two sites on the east coast of the United States. *J. Shellfish Res.*
- Figueras, A. J., Jardon, C. F., & Caldas, J. R. (1991b). Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): preliminary results. *Aquaculture*, 99(1–2), 17–33. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90285-F](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90285-F)
- Floerl, O., Inglis, G. J., Dey, K., & Smith, A. (2009). The importance of transport hubs in stepping-stone invasions. *Journal of Applied Ecology*, 46(1), 37–45. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2664.2008.01540.X>
- Fraïsse, C. (2014). *Génétique de l'adaptation et de la spéciation : théorie et analyse de données de séquençage haut-débit dans le complexe d'espèces Mytilus edulis*.

- Fraïsse, C., Belkhir, K., Welch, J. J., & Bierne, N. (2016). Local interspecies introgression is the main cause of extreme levels of intraspecific differentiation in mussels. *Molecular Ecology*, 25(1), 269–286. <https://doi.org/10.1111/mec.13299>
- Fraïsse, C., Roux, C., Gagnaire, P. A., Romiguier, J., Faivre, N., Welch, J. J., & Bierne, N. (2018). The divergence history of European blue mussel species reconstructed from Approximate Bayesian Computation: The effects of sequencing techniques and sampling strategies. *PeerJ*, 2018(7), e5198. <https://doi.org/10.7717/peerj.5198>
- Fridman, J. S., & Lowe, S. W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22(56 REV. ISS. 8), 9030–9040. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207116>
- Fuentes, J., López, J., Mosquera, E., Vázquez, J., Villalba, A., & Álvarez, G. (2002). Growth, mortality, pathological conditions and protein expression of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* crosses cultured in the Ría de Arousa (NW of Spain). *Aquaculture*, 213(1–4), 233–251. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00046-7)
- Fuhrmann, M., Georgiades, E., Cattell, G., Brosnahan, C., Lane, H. S., & Hick, P. M. (2021). Aquatic pathogens and biofouling: pilot study of ostreid herpesvirus 1 translocation by bivalves. <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1985474>, 1–15.
- Galimany, E., & Sunila, I. (2008). Several Cases of Disseminated Neoplasia in Mussels *Mytilus edulis* (L.) in Western Long Island Sound. *Journal of Shellfish Research*, 27(5), 1201–1207. <https://doi.org/10.2983/0730-8000-27.5.1201>
- Galloway, T. S., & Depledge, M. H. (2001). Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance. *Ecotoxicology* 2001 10:1, 10(1), 5–23. <https://doi.org/10.1023/A:1008939520263>
- Ganz, H. H., & Ebert, D. (2010). Benefits of host genetic diversity for resistance to infection depend on parasite diversity. *Ecology*, 91(5), 1263–1268. <https://doi.org/10.1890/09-1243.1>
- Garcia-Souto, D., Bruzos, A. L., Diaz, S., Rocha, S., Pequeño, A., Roman-Lewis, C. F., ... Tubio, J. M. C. (2021). Mitochondrial genome sequencing of marine leukemias reveals cancer contagion between clam species in the Seas of Southern Europe. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.03.10.434714>
- Gärtner, H.-V., Seidl, C., Luckenbach, C., Schumm, G., Seifried, E., Ritter, H., & Bültmann, B. (1996). Genetic Analysis of a Sarcoma Accidentally Transplanted from a Patient to a Surgeon. *New England Journal of Medicine*, 335(20), 1494–1497. <https://doi.org/10.1056/NEJM199611143352004>
- Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2008). A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 8(1), 56–61. <https://doi.org/10.1038/NRC2255>
- Georgiades, E., Scianni, C., Davidson, I., Tamburri, M. N., First, M. R., Ruiz, G., ... Kluza, D. (2021). The Role of Vessel Biofouling in the Translocation of Marine Pathogens: Management Considerations and Challenges. *Frontiers in Marine Sciences*, 8(660125). <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.660125>
- Gerdol, M., De Moro, G., Manfrin, C., Milandri, A., Riccardi, E., Beran, A., ... Pallavicini, A. (2014). RNA sequencing and de novo assembly of the digestive gland transcriptome in *Mytilus galloprovincialis* fed with toxinogenic and non-toxic strains of *Alexandrium minutum*. *BMC Research Notes* 2014 7:1,

7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-722>

- Gerdol, M., Manfrin, C., De Moro, G., Figueras, A., Novoa, B., Venier, P., & Pallavicini, A. (2011). The C1q domain containing proteins of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: A widespread and diverse family of immune-related molecules. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(6), 635–643. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2011.01.018>
- Gerdol, M., Moreira, R., Cruz, F., Gómez-Garrido, J., Vlasova, A., Rosani, U., ... Figueras, A. (2020). Massive gene presence-absence variation shapes an open pan-genome in the Mediterranean mussel. *Genome Biology* 2020 21:1, 21(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S13059-020-02180-3>
- Gerdol, M., & Venier, P. (2015). An updated molecular basis for mussel immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(1), 17–38. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2015.02.013>
- Gibson, A. K., Jokela, J., & Lively, C. M. (2016). Fine-Scale Spatial Covariation between Infection Prevalence and Susceptibility in a Natural Population. <https://doi.org/10.1086/686767>, 188(1), 1–14. <https://doi.org/10.1086/686767>
- Gilg, M. R., & Hilbish, T. J. (2003). THE GEOGRAPHY OF MARINE LARVAL DISPERSAL: COUPLING GENETICS WITH FINE-SCALE PHYSICAL OCEANOGRAPHY. *Ecology*, 84(11), 2989–2998. <https://doi.org/10.1890/02-0498>
- Girón-Pérez, M. I. (2010). Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution. *ISJ*, 7, 149–156.
- Gombač, M., Sitar, R., Pogačnik, M., Arzul, I., & Jenčič, V. (2013). Haemocytic neoplasia in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Slovene Adriatic Sea. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 46(2), 135–143. <https://doi.org/10.1080/10236244.2013.782736>
- Gosling, E. (2003). *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*. Fishing News Books, a division of Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. <https://doi.org/10.1038/nature10762>
- Green, M., & Alderman, D. J. (1983). Neoplasia in *Mytilus edulis* L. from United Kingdom waters. *Aquaculture*, 30(1–4), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90146-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90146-1)
- Green, T. J., Jones, B. J., Adlard, R. D., & Barnes, A. C. (2008). Parasites, pathological conditions and mortality in QX-resistant and wild-caught Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. *Aquaculture*, 280(1–4), 35–38. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2008.04.004>
- Gugel, E., & Sanders, M. (1986). Needle-stick transmission of human colonic adenocarcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 315(23), 1487–1487. <https://doi.org/10.1056/NEJM198612043152314>
- Hammel, M., Simon, A., Arbiol, C., Villalba, A., Burioli, E. A. V., Pépin, J.-F., ... Bierne, N. (2021). Prevalence and polymorphism of a mussel transmissible cancer in Europe. *Molecular Ecology*, 00, 1–16. <https://doi.org/10.1111/MEC.16052>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000, January 7). The hallmarks of cancer. *Cell*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011a). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011b, March 4). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanington, P. C., Forsys, M. A., Drago, J. W., Zhang, S.-M., Adema, C. M., & Loker, E. S. (2010). Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(49), 21087–21092. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1011242107>
- Hanington, P. C., & Zhang, S.-M. (2011). The Primary Role of Fibrinogen-Related Proteins in Invertebrates Is Defense, Not Coagulation. *Journal of Innate Immunity*, *3*(1), 17–27. <https://doi.org/10.1159/000321882>
- Hawkins, C. E., Baars, C., Hesterman, H., Hocking, G. J., Jones, M. E., Lazenby, B., ... Wiersma, J. (2006). Emerging disease and population decline of an island endemic, the Tasmanian devil *Sarcophilus harrisii*. *Biological Conservation*, *131*(2), 307–324. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2006.04.010>
- Heil, M. (2016). Host Manipulation by Parasites: Cases, Patterns, and Remaining Doubts. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *0*(JUN), 80. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2016.00080>
- Hillman, R., Lordo, R., Menton, R., Peven, C., Uhler, A. D., Crecelius, E., & Steinhauer, W. G. (1992). Relationship of environmental contaminants to occurrence of neoplasia in mussels (*Mytilus edulis*) from East and West Coast Mussel Watch sites. *Proc. MTS '92*, *1*, 230–239.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, *253*(5015), 49–53. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1905840>
- Hopkins, S. R., Fleming-Davies, A. E., Belden, L. K., & Wojdak, J. M. (2020). Systematic review of modelling assumptions and empirical evidence: Does parasite transmission increase nonlinearly with host density? *Methods in Ecology and Evolution*, *11*(4), 476–486. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13361>
- Hsiao, Y. W., Liao, K. W., Chung, T. F., Liu, C. H., Hsu, C. Da, & Chu, R. M. (2008). Interactions of host IL-6 and IFN- γ and cancer-derived TGF- β 1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *57*(7), 1091–1104. <https://doi.org/10.1007/S00262-007-0446-5>
- Hughes, D. P., & Libersat, F. (2019). Parasite manipulation of host behavior. *Current Biology*, *29*(2), R45–R47. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2018.12.001>
- Isoda, T., Ford, A. M., Tomizawa, D., Van Delft, F. W., Gonzalez De Castro, D., Mitsui, N., ... Rowley, J. D. (2009). Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring. *PNAS*, *106*(42), 17882–17885. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/pnas/106/42/17882.full.pdf>
- Jemaà, M., Morin, N., Cavelier, P., Cau, J., Strub, J. M., & Delsert, C. (2014). Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters. *Journal of Experimental Biology*, *217*(17), 3067–3077. <https://doi.org/10.1242/JEB.106575>
- Kent, M. L., Wilkinson, M. T., Drum, A. S., & Elston, R. A. (1991). Failure of transmission of hemic

- neoplasia of bay mussels, *Mytilus trossulus*, to other bivalve species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57(3), 435–436. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90148-J](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90148-J)
- Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*, 141(1), 52–67. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.03.015>
- Khalaman, V. V., & Lezin, P. A. (2015). Clumping behavior and byssus production as strategies for substrate competition in *Mytilus edulis*. *Invertebrate Biology*, 134(1), 38–47. <https://doi.org/10.1111/IVB.12075>
- Knoll, A. H. (2011). The Multiple Origins of Complex Multicellularity. <http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Earth.031208.100209>, 39, 217–239. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.EARTH.031208.100209>
- Knudson, A. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68(4), 820–823. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.4.820>
- Knudson, A. G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer Alfred. *Nature Reviews Cancer*, 1(2), 157–162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/35101031>
- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., ... Schreiber, R. D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 450(7171), 903–907. <https://doi.org/10.1038/NATURE06309>
- Kolde, R. (2018). Package “pheatmap.”
- Krishnakumar, P. K., Casillas, E., Snider, R. G., Kagley, A. N., & Varanasi, U. (1999). Environmental Contaminants and the Prevalence of Hemic Neoplasia (Leukemia) in the Common Mussel (*Mytilus edulis* Complex) from Puget Sound, Washington, U.S.A. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(2), 135–146. <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4798>
- Kwon, Y. M., Gori, K., Park, N., Potts, N., Swift, K., Wang, J., ... Murchison, E. P. (2020). Evolution and lineage dynamics of a transmissible cancer in Tasmanian devils. *PLoS Biology*, 18(11), e3000926. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000926>
- Kwon, Y. M., Stammnitz, M. R., Wang, J., Swift, K., Knowles, G. W., Pye, R. J., ... Murchison, E. P. (2018). Tasman-PCR: a genetic diagnostic assay for Tasmanian devil facial tumour diseases. *Royal Society Open Science*, 5(10). <https://doi.org/10.1098/RSOS.180870>
- Landsberg, J. H. (1996). Neoplasia and biotoxins in bivalves: Is there a connection? *Journal of Shellfish Research*, 15(2), 203–230.
- Langie, S. A. S., Koppen, G., Desaulniers, D., Al-Mulla, F., Al-Temaimi, R., Amedei, A., ... Collins, A. R. (2015). Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis*, 36(Suppl_1), S61–S88. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGV031>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 2012 9:4, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Le Foll, F., Rioult, D., Boussa, S., Pasquier, J., Dagher, Z., & Le Boulenger, F. (2010). Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(2), 372–386. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2009.11.011>

- Le Grand, F., Kraffe, E., Montaudouin, X. de, Villalba, A., Marty, Y., & Soudant, P. (2010). Prevalence, intensity, and aneuploidy patterns of disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*) from Arcachon Bay: Seasonal variation and position in sediment. *Journal of Invertebrate Pathology*, *104*(2), 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.01.011>
- Leathlobhair, M. N., Gulland, F. M. D., & Murchison, E. P. (2017). No evidence for clonal transmission of urogenital carcinoma in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Wellcome Open Research*, *2*, 46. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.11483.1>
- Leathlobhair, M. N., Perri, A. R., Irving-Pease, E. K., Witt, K. E., Linderholm, A., Haile, J., ... Frantz, L. A. F. (2018). The evolutionary history of dogs in the Americas. *Science*, *361*(6397), 81–85. <https://doi.org/10.1126/science.aao4776>
- Leroi, A. M., Koufopanou, V., & Burt, A. (2003). Cancer selection. *Nature Reviews Cancer*, *3*(3), 226–231. <https://doi.org/10.1038/nrc1016>
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, *88*(3), 323–331. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81871-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81871-1)
- Li, H., Parisi, M. G., Toubiana, M., Cammarata, M., & Roch, P. (2008). Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. *Fish & Shellfish Immunology*, *25*(1–2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2008.04.001>
- Lievens, E. J. P., Rode, N. O., Landes, J., Segard, A., Jabbour-Zahab, R., Michalakis, Y., & Lenormand, T. (2019). Long-term prevalence data reveals spillover dynamics in a multi-host (*Artemia*), multi-parasite (Microsporidia) community. *International Journal for Parasitology*, *49*(6), 471–480. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2019.01.002>
- Lima, T. G., & McCartney, M. A. (2013). Adaptive Evolution of M3 Lysin—A Candidate Gamete Recognition Protein in the *Mytilus edulis* Species Complex. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2688–2698. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MST165>
- Lohrmann, K. B., Bustos, E., Rojas, R., Navarrete, F., Robotham, H., & Bignell, J. (2019). Histopathological assessment of the health status of *Mytilus chilensis* (Hupé 1854) in southern Chile. *Aquaculture*, *503*, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.080>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* *2014 15:12*, *15*(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8>
- Lowe, D. M., & Moore, M. N. (1978). Cytology and Quantitative Cytochemistry of a Proliferative Atypical Hemocytic Condition in *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mollusca). *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *60*(6), 1455–1459. <https://doi.org/10.1093/JNCI/60.6.1455>
- Lubet, P. (1959). *RECHERCHES SUR LE CYCLE SEXUEL ET L'EMISSION DES GAMETES CHEZ LES MYTILIDES E'r LES PEC11NIDES (Mollusques bivalves)*.
- Luna-Acosta, A., Breitwieser, M., Renault, T., & Thomas-Guyon, H. (2017). Recent findings on phenoloxidases in bivalves. *Marine Pollution Bulletin*, *122*(1–2), 5–16. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2017.06.031>

- Lupo, C., Bougeard, S., Le Bihan, V., Blin, J. L., Allain, G., Azéma, P., ... Le Bouquin, S. (2021). Mortality of marine mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*: systematic literature review of risk factors and recommendations for future research. *Reviews in Aquaculture*, *13*(1), 504–536. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12484>
- Marchal, T., Chabanne, L., Kaplanski, C., Rigal, D., & Magnol, J. P. (1997). Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *57*(1–2), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(96\)05757-1](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(96)05757-1)
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, *17*(1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/EJ.17.1.200>
- Martins, E., Figueras, A., Novoa, B., Santos, R. S., Moreira, R., & Bettencourt, R. (2014). Comparative study of immune responses in the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* and the shallow-water mussel *Mytilus galloprovincialis* challenged with *Vibrio* bacteria. *Fish & Shellfish Immunology*, *40*(2), 485–499. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2014.07.018>
- Matozzo, V., Ercolini, C., Serracca, L., Battistini, R., Rossini, I., Granato, G., ... Quaglio, F. (2018). Assessing the health status of farmed mussels (*Mytilus galloprovincialis*) through histological, microbiological and biomarker analyses. *Journal of Invertebrate Pathology*, *153*, 165–179. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.018>
- Mayrand, E., St-Jean, S. D., & Courtenay, S. C. (2005). Haemocyte responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: can the immune system recuperate? *Aquaculture Research*, *36*(10), 962–971. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2109.2005.01302.X>
- McCallum, H., Tompkins, D. M., Jones, M., Lachish, S., Marvanek, S., Lazenby, B., ... Hawkins, C. E. (2007, September 11). Distribution and impacts of Tasmanian devil facial tumor disease. *EcoHealth*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s10393-007-0118-0>
- McGladdery, S. E., Reinisch, C. L., MacCallum, G. S., Stephens, R. E., Walker, C. L., & Davidson, J. (2001). Haemic neoplasia in soft-shell clams (*Mya arenaria*): recent outbreaks in Atlantic Canada and discovery of a p53 gene homologue associated with the condition. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*, *101*(3), 19–26. Retrieved from <https://islandscholar.ca/islandora/object/ir%3A2716/>
- McQuaid, C. D., & Phillips, T. E. (2000). Limited wind-driven dispersal of intertidal mussel larvae: in situ evidence from the plankton and the spread of the invasive species *Mytilus galloprovincialis* in South Africa. *Marine Ecology Progress Series*, *201*, 211–220. <https://doi.org/10.3354/MEPS201211>
- Merlo, L. M. F., Pepper, J. W., Reid, B. J., & Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process, *6*(December), 924–935. <https://doi.org/10.1038/nrc2013>
- Metzger, M. J., Reinisch, C., Sherry, J., & Goff, S. P. (2015). Horizontal transmission of clonal cancer cells causes leukemia in soft-shell clams. *Cell*, *161*(2), 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.042>
- Metzger, M. J., Villalba, A., Carballal, M. J., Iglesias, D., Sherry, J., Reinisch, C., ... Goff, S. P. (2016). Widespread transmission of independent cancer lineages within multiple bivalve species. *Nature*, *534*(7609), 705–709. <https://doi.org/10.1038/nature18599>

- Miccoli, A., Picchiatti, S., Fausto, A. M., & Scapigliati, G. (2021). Evolution of immune defence responses as incremental layers among Metazoa. <https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1849435>, 88(1), 44–57. <https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1849435>
- Minchella, D. J., & Loverde, P. T. (1981). A Cost of Increased Early Reproductive Effort in the Snail *Biomphalaria glabrata*. *The American Naturalist*, 118(6), 876–881.
- Miroshnychenko, D., Baratchart, E., Ferrall-Fairbanks, M. C., Velde, R. Vander, Laurie, M. A., Bui, M. M., ... Marusyk, A. (2021). Spontaneous cell fusions as a mechanism of parasexual recombination in tumour cell populations. *Nature Ecology and Evolution*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01367-y>
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., & Roch, P. (1999). Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *Journal of Cell Science*, 112(23), 4233–4242. <https://doi.org/10.1242/JCS.112.23.4233>
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Noel, T., Romestand, B., Beauvillain, J. C., Salzet, M., & Roch, P. (2000). Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. *Journal of Cell Science*, 113(15), 2759–2769. <https://doi.org/10.1242/JCS.113.15.2759>
- Mix, M. C. (1983). Haemic neoplasms of bay mussels, *Mytilus edulis* L., from Oregon: occurrence, prevalence, seasonality and histopathological progression. *Journal of Fish Diseases*, 6(3), 239–248. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2761.1983.TB00072.X>
- Mix, M., Hawkes, J. W., & Sparks, A. K. (1979). Observations on the ultrastructure of large cells associated with putative neoplastic disorders of mussels, *Mytilus edulis*, from Yaquina Bay, Oregon. *Journal of Invertebrate Pathology*, 34(1), 41–56. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(79\)90052-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(79)90052-1)
- Mix, Michael C. (1975). Proliferative characteristics of atypical cells in native oysters (*Ostrea lurida*) from Yaquina bay, Oregon. *Journal of Invertebrate Pathology*, 26(3), 289–298. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(75\)90224-4](https://doi.org/10.1016/0022-2011(75)90224-4)
- Molina-Cruz, A., Garver, L. S., Alabaster, A., Bangiolo, L., Haile, A., Winikor, J., ... Barillas-Mury, C. (2013). The human malaria parasite Pfs47 gene mediates evasion of the mosquito immune system. *Science*, 340(6135), 984–987. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1235264>
- Møller, A. P., Bonisoli-Alquati, A., & Mousseau, T. A. (2013). High frequency of albinism and tumours in free-living birds around Chernobyl. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 757(1), 52–59. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2013.04.019>
- Moné, Y., Gourbal, B., Duval, D., Pasquier, L. Du, Kieffer-Jaquinod, S., & Mitta, G. (2010). A Large Repertoire of Parasite Epitopes Matched by a Large Repertoire of Host Immune Receptors in an Invertebrate Host/Parasite Model. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(9), e813. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0000813>
- Moné, Y., Ribou, A. C., Cosseau, C., Duval, D., Théron, A., Mitta, G., & Gourbal, B. (2011). An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni*/*Biomphalaria glabrata* interactions. *International Journal for Parasitology*, 41(7), 721–730. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2011.01.007>
- Moore, J. D., Elston, R. A., Drum, A. S., & Wilkinson, M. T. (1991). Alternate pathogenesis of systemic

- neoplasia in the bivalve mollusc *Mytilus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58(2), 231–243.
[https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90067-Z](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90067-Z)
- Moreau, P., Moreau, K., Segarra, A., Tourbiez, D., Travers, M.-A., Rubinsztein, D. C., & Renault, T. (2015). Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/15548627.2015.1017188*, 11(3), 516–526.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017188>
- Moreira, D., Rodrigues, V., Abengozar, M., Rivas, L., Rial, E., Laforge, M., ... Silvestre, R. (2015). *Leishmania infantum* Modulates Host Macrophage Mitochondrial Metabolism by Hijacking the SIRT1-AMPK Axis. *PLOS Pathogens*, 11(3), e1004684.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004684>
- Moreira, R., Balseiro, P., Forn-Cuní, G., Milan, M., Bargelloni, L., Novoa, B., & Figueras, A. (2018). Bivalve transcriptomics reveal pathogen sequences and a powerful immune response of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Marine Biology*, 165(4), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s00227-018-3308-0>
- Mozos, E., Méndez, A., Gómez-Villamandos, J. C., Mulas, J. M. de las, & Pérez, J. (2016). Immunohistochemical Characterization of Canine Transmissible Venereal Tumor: *Http://Dx.Doi.Org/10.1177/030098589603300301*, 33(3), 257–263.
<https://doi.org/10.1177/030098589603300301>
- Muehlenbachs, A., Bhatnagar, J., Agudelo, C. A., Hidron, A., Eberhard, M. L., Mathison, B. A., ... Zaki, S. R. (2015). Malignant Transformation of *Hymenolepis nana* in a Human Host. *Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMoa1505892*, 373(19), 1845–1852.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1505892>
- Murchison, E. P., Tovar, C., Hsu, A., Bender, H. S., Kheradpour, P., Rebbeck, C. A., ... Papenfuss, A. T. (2010). The Tasmanian devil transcriptome reveals schwann cell origins of a clonally transmissible cancer. *Science*, 327(5961), 84–87. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1180616>
- Murgia, C., Pritchard, J. K., Kim, S. Y., Fassati, A., & Weiss, R. A. (2006). Clonal Origin and Evolution of a Transmissible Cancer. *Cell*, 126(3), 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.051>
- Murray, C. C., Pakhomov, E. A., & Therriault, T. W. (2011). Recreational boating: a large unregulated vector transporting marine invasive species. *Diversity and Distributions*, 17(6), 1161–1172.
<https://doi.org/10.1111/J.1472-4642.2011.00798.X>
- Muttray, A. F., Cox, R. L., Reinisch, C. L., & Baldwin, S. A. (2007). Identification of DeltaN Isoform and Polyadenylation Site Choice Variants in Molluscan p63/p73-Like Homologues. *Marine Biotechnology* 2007 9:2, 9(2), 217–230. <https://doi.org/10.1007/S10126-006-6045-1>
- Muttray, A. F., Schulte, P. M., & Baldwin, S. A. (2008). Invertebrate p53-like mRNA isoforms are differentially expressed in mussel haemic neoplasia. *Marine Environmental Research*, 66(4), 412–421. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.06.004>
- Muttray, A., Reinisch, C., Miller, J., Ernst, W., Gillis, P., Losier, M., & Sherry, J. (2012). Haemocytic leukemia in Prince Edward Island (PEI) soft shell clam (*Mya arenaria*): Spatial distribution in agriculturally impacted estuaries. *Science of The Total Environment*, 424, 130–142.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2012.02.029>

- Nguyen, D. X., Bos, P. D., & Massagué, J. (2009). Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 274–284. <https://doi.org/10.1038/nrc2622>
- Nguyen, V.-H. (2009). Traitement par aliéne des comparaisons intensives de séquences génomiques.
- Ní Leathlobhair, M., Yetsko, K., Farrell, J. A., Iaria, C., Marino, G., Duffy, D. J., & Murchison, E. P. (2021). Genotype data not consistent with clonal transmission of sea turtle fibropapillomatosis or goldfish schwannoma. *Wellcome Open Research* 2021 6:219, 6, 219. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.17073.1>
- Niklas, K. J., & Newman, S. A. (2013). The origins of multicellular organisms. *Evolution & Development*, 15(1), 41–52. <https://doi.org/10.1111/EDE.12013>
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in Cancer. *Vascular Health and Risk Management*, 2(3), 213. <https://doi.org/10.2147/VHRM.2006.2.3.213>
- Noble, R., Kaltz, O., Nunney, L., & Hochberg, M. E. (2016). Overestimating the Role of Environment in Cancers. *Cancer Prevention Research*, 9(10), 773–776. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0126>
- Noel, D. (1992). *Etude des hémocytes et d'une néoplasie hémocytaire chez les moules Mytilus edulis*.
- Noël, D., Bachère, E., & Mialhe, E. (1993). Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Developmental & Comparative Immunology*, 17(6), 483–493. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(05\)80004-7](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(05)80004-7)
- Noel, D., Boulo, V., Chagot, D., Mialhe, E., Paolucci, F., Clavies, C., ... Elston, R. (1991). Preparation and characterization of monoclonal antibodies against neoplastic hemocytes of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms*, 10, 51–58.
- Noubissi, F. K., & Ogle, B. M. (2016, September 21). Cancer cell fusion: Mechanisms slowly unravel. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17091587>
- Nowak, M. A., & Waclaw, B. (2017). Genes, environment, and “bad luck.” *Science*, 355(6331), 1266–1267. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAM9746>
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260), 23–28. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.959840>
- Nunney, L. (2020). Resolving Peto’s paradox: Modeling the potential effects of size-related metabolic changes, and of the evolution of immune policing and cancer suppression. *Evolutionary Applications*, 13(7), 1581–1592. <https://doi.org/10.1111/EVA.12993>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., ... Maintainer, H. W. (2020). Package “vegan” - Community Ecology Package Version 2.5-7.
- Oprandy, J. J., & Chang, P. W. (1983). 5-Bromodeoxyuridine induction of hematopoietic neoplasia and retrovirus activation in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 42(2), 196–206. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(83\)90062-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90062-9)
- Oprandy, J. J., Chang, P. W., Pronovost, A. D., Cooper, K. R., Brown, R. S., & Yates, V. J. (1981). Isolation of a viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Journal of*

Invertebrate Pathology, 38(1), 45–51. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90033-1)

- Ordás, M. C., & Figueras, A. (2005). Histopathological study of abnormal mortalities of cockle (*Cerastoderma edule*) in Carril (Galicia, NW Spain). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 25(3), 124.
- Pales Espinosa, E., Corre, E., & Allam, B. (2014). Pallial mucus of the oyster *Crassostrea virginica* regulates the expression of putative virulence genes of its pathogen *Perkinsus marinus*. *International Journal for Parasitology*, 44(5), 305–317. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2014.01.006>
- Pales Espinosa, E., Perrigault, M., & Allam, B. (2010). Identification and molecular characterization of a mucosal lectin (MeML) from the blue mussel *Mytilus edulis* and its potential role in particle capture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 156(4), 495–501. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2010.04.004>
- Papkou, A., Guzella, T., Yang, W., Koepper, S., Pees, B., Schalkowski, R., ... Schulenburg, H. (2019). The genomic basis of Red Queen dynamics during rapid reciprocal host–pathogen coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(3), 923–928. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1810402116>
- Pariseau, J., Saint-Louis, R., Delaporte, M., El Khair, M. A., McKenna, P., Tremblay, R., ... Berthe, F. C. J. (2009). Potential link between exposure to fungicides chlorothalonil and mancozeb and haemic neoplasia development in the soft-shell clam *Mya arenaria*: A laboratory experiment. *Marine Pollution Bulletin*, 58(4), 503–514. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2008.12.011>
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N., & Sibley, R. K. (2010). *Helicobacter pylori* Infection and the Risk of Gastric Carcinoma. <http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJM199110173251603>, 325(16), 1127–1131. <https://doi.org/10.1056/NEJM199110173251603>
- Patton, A. H., Lawrance, M. F., Margres, M. J., Kozakiewicz, C. P., Hamede, R., Ruiz-Aravena, M., ... Storfer, A. (2020). A transmissible cancer shifts from emergence to endemism in Tasmanian devils. *Science*, 370(6522), eabb9772. <https://doi.org/10.1126/science.abb9772>
- Pearse, A. M., & Swift, K. (2006). Allograft theory: Transmission of devil facial-tumour disease. *Nature*, 439(7076), 549. <https://doi.org/10.1038/439549a>
- Pepin, J. F., Benabdelmouna, A., Degremont, L., Guesdon, S., Le Moine, O., Morga, B., ... Soletchnik, P. (2017). Mortalités de moules bleues dans les secteurs mytilicoles charentais et vendéens : description et facteurs liés – MORBLEU, 93.
- Perret, C., Gidoin, C., Ujvari, B., Thomas, F., & Roche, B. (2020). Predation shapes the impact of cancer on population dynamics and the evolution of cancer resistance. *Evolutionary Applications*, 13(7), 1733–1744. <https://doi.org/10.1111/EVA.12951>
- Pertea, G., & Pertea, M. (2020). GFF Utilities: GffRead and GffCompare. *F1000Research* 2020 9:304, 9, 304. <https://doi.org/10.12688/f1000research.23297.1>
- Peters, E. C. (1988). Recent investigations on the disseminated sarcomas of marine bivalve molluscs. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.*, 18, 74–92.
- Peto, R., Roe, F. J., Lee, P. N., Levy, L., & Clack, J. (1975). Cancer and ageing in mice and men. *British*

Journal of Cancer 1975 32:4, 32(4), 411–426. <https://doi.org/10.1038/bjc.1975.242>

- Petrovic, F., & Guichard, F. (2008). Scales of *Mytilus* spp. population dynamics: importance of adult displacement and aggregation. *Marine Ecology Progress Series*, 356, 203–214. <https://doi.org/10.3354/MEPS07250>
- Philipp, E. E. R., Kraemer, L., Melzner, F., Poustka, A. J., & Thieme, S. (2012). Massively Parallel RNA Sequencing Identifies a Complex Immune Gene Repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS ONE*, 7(3), 33091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033091>
- Pienta, K. J., Hammarlund, E. U., Axelrod, R., Brown, J. S., & Amend, S. R. (2020). Poly-aneuploid cancer cells promote evolvability, generating lethal cancer. *Evolutionary Applications*, 13(7), 1626–1634. <https://doi.org/10.1111/eva.12929>
- Pike, V. L., Lythgoe, K. A., & King, K. C. (2019). On the diverse and opposing effects of nutrition on pathogen virulence. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1906). <https://doi.org/10.1098/RSPB.2019.1220>
- Pila, E. A., Sullivan, J. T., Wu, X. Z., Fang, J., Rudko, S. P., Gordy, M. A., & Hanington, P. C. (2016). Haematopoiesis in molluscs: A review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 119–128. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2015.11.010>
- Pinaud, S., Portela, J., Duval, D., Nowacki, F. C., Olive, M.-A., Allienne, J.-F., ... Gourbal, B. (2016). A Shift from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail *Biomphalaria glabrata*. *PLoS Pathogens*, 12(1), e1005361. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005361>
- Pipe, R. K. (1990). Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *The Histochemical Journal* 1990 22:11, 22(11), 595–603. <https://doi.org/10.1007/BF01072941>
- Pipe, Richard K., Farley, S. R., & Coles, J. A. (1997). The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell and Tissue Research* 1997 289:3, 289(3), 537–545. <https://doi.org/10.1007/S004410050899>
- Popovic, I., Matias, A. M. A., Bierne, N., & Riginos, C. (2020). Twin introductions by independent invader mussel lineages are both associated with recent admixture with a native congener in Australia. *Evolutionary Applications*, 13(3), 515–532. <https://doi.org/10.1111/eva.12857>
- Poulin, R. (2010). Parasite Manipulation of Host Behavior: An Update and Frequently Asked Questions. *Advances in the Study of Behavior*, 41(C), 151–186. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(10\)41005-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(10)41005-0)
- Pradeu, T., & Du Pasquier, L. (2018). Immunological memory: What's in a name? *Immunological Reviews*, 283(1), 7–20. <https://doi.org/10.1111/IMR.12652>
- Pye, R. J., Pemberton, D., Tovar, C., Tubio, J. M. C., Dun, K. A., Fox, S., ... Woods, G. M. (2016). A second transmissible cancer in Tasmanian devils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(2), 374–379. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519691113>

- Quesada, H., Wenne, R., & Skibinski, D. O. F. (1995). Differential introgression of mitochondrial DNA across species boundaries within the marine mussel genus *Mytilus*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 262(1363), 51–56. <https://doi.org/10.1098/RSPB.1995.0175>
- Quevillon, E., V, S., S, P., N, H., N, M., R, A., & R, L. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKI442>
- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. Retrieved from <http://www.r-project.org/index.html>
- Rasmussen, L. P. D. (1986). Occurrence, prevalence and seasonality of neoplasia in the marine mussel *Mytilus edulis* from three sites in Denmark. *Marine Biology: International Journal on Life in Oceans and Coastal Waters*, 92(1), 59–64. <https://doi.org/10.1007/BF00392746>
- Rebbeck, C. A., Thomas, R., Breen, M., Leroi, A. M., & Burt, A. (2009). ORIGINS AND EVOLUTION OF A TRANSMISSIBLE CANCER. *Evolution*, 63(9), 2340–2349. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00724.x>
- Reimer, O., & Tedengren, M. (2009). Predator-induced changes in byssal attachment, aggregation and migration in the blue mussel, *Mytilus edulis*. <http://Dx.Doi.Org/10.1080/10236249709379029>, 30(4), 251–266. <https://doi.org/10.1080/10236249709379029>
- Reinisch, C. L., Charles, A. M., & Stone, A. M. (1984). Epizootic Neoplasia in Soft Shell Clams Collected from New Bedford Harbor. *Hazardous Waste*, 1(1), 73–81. <https://doi.org/10.1089/HZW.1984.1.73>
- Reinisch, C. L., Charles, A. M., & Troutner, J. (1983). Unique antigens on neoplastic cells of the soft shell clam *Mya arenaria*. *Developmental & Comparative Immunology*, 7(1), 33–39. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(83\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0145-305X(83)90052-6)
- Renault, T. (2015). Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(1), 88–93. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2015.04.011>
- Reno, P. W., House, M., & Illingworth, A. (1994). Flow cytometric and chromosome analysis of softshell clams, *Mya arenaria*, with disseminated neoplasia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64(3), 163–172. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(94)90025-6)
- Riedel, H. (2007). Models for Tumour Growth and Differentiation. *The Cancer Handbook*. <https://doi.org/10.1002/9780470025079.CHAP61.PUB2>
- Riquet, F., Simon, A., & Bierne, N. (2017). Weird genotypes? Don't discard them, transmissible cancer could be an explanation. *Evolutionary Applications*, 10(2), 140–145. <https://doi.org/10.1111/eva.12439>
- Roche, B., Hochberg, M. E., Caulin, A. F., Maley, C. C., Gatenby, R. A., Misse, D., & Thomas, F. (2012). Natural resistance to cancers: a Darwinian hypothesis to explain Peto's paradox. *BMC Cancer* 2012 12:1, 12(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-387>
- Romalde, J. L., Luz Vilariño, M., Beaz, R., Rodríguez, J. M., Díaz, S., Villalba, A., & Carballal, M. J. (2007). Evidence of retroviral etiology for disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(2), 95–101. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2006.09.007>
- Romero, A., Novoa, B., & Figueras, A. (2015). The complexity of apoptotic cell death in mollusks: An

- update. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(1), 79–87. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2015.03.038>
- Romero, Alejandro, Dios, S., Poisa-Beiro, L., Costa, M. M., Posada, D., Figueras, A., & Novoa, B. (2011). Individual sequence variability and functional activities of fibrinogen-related proteins (FREPs) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(3), 334–344. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2010.10.007>
- Rothschild, B. M., Tanke, D., Hershkovitz, I., & Schultz, M. (1998). Mesozoic neoplasia: Origins of haemangioma in the Jurassic age. *Lancet*, 351(9119), 1862. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)78809-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)78809-7)
- Saco, A., Rey-Campos, M., Rosani, U., Novoa, B., & Figueras, A. (2021). The Evolution and Diversity of Interleukin-17 Highlight an Expansion in Marine Invertebrates and Its Conserved Role in Mucosal Immunity. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.692997>
- Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C., & Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 370(9590), 890–907. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61416-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61416-0)
- Schmid-Hempel, P. (2008). Parasite immune evasion: a momentous molecular war. *Trends Ecol Evo*, 23(6), 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.02.011>
- Schoenfelder, K. P., & Fox, D. T. (2015). The expanding implications of polyploidy. *Journal of Cell Biology*, 209(4), 485–491. <https://doi.org/10.1083/JCB.201502016>
- Seed, R. (1969). The incidence of the Pea crab, *Pinnotheres pisum* in the two types of *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia) from Padstow, south-west England.
- Siah, A., McKenna, P., Danger, J. M., Johnson, G. R., & Berthe, F. C. J. (2011). Induction of transposase and polyprotein RNA levels in disseminated neoplastic hemocytes of soft-shell clams: *Mya arenaria*. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(2), 151–154. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2010.09.012>
- Siddle, H. V., & Kaufman, J. (2013). A tale of two tumours: Comparison of the immune escape strategies of contagious cancers. *Molecular Immunology*, 55(2), 190–193. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2012.10.017>
- Simon, A. (2019). *Génomique de l' hybridation anthropogénique chez les moules Mytilus spp . et valeur sélective des hybrides.*
- Simon, A., Arbiol, C., Nielsen, E. E., Couteau, J., Sussarellu, R., Burgeot, T., ... Bierne, N. (2020). Replicated anthropogenic hybridisations reveal parallel patterns of admixture in marine mussels. *Evolutionary Applications*, 13(3), 575–599. <https://doi.org/10.1111/eva.12879>
- Simon, A., Fraïsse, C., El Ayari, T., Liautard-Haag, C., Strelkov, P., Welch, J. J., & Bierne, N. (2021). How do species barriers decay? Concordance and local introgression in mosaic hybrid zones of mussels. *Journal of Evolutionary Biology*, 34(1), 208–223. <https://doi.org/10.1111/jeb.13709>
- Skazina, M., Odintsova, N., Maiorova, M., Ivanova, A., Väinölä, R., & Strelkov, P. (2021). First description of a widespread *Mytilus trossulus*-derived bivalve transmissible cancer lineage in *M. trossulus* itself.

- Scientific Reports*, 11(5809). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85098-5>
- Smith, K. R., Hanson, H. A., Mineau, G. P., & Buys, S. S. (2012). Effects of BRCA1 and BRCA2 mutations on female fertility. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1732), 1389–1395. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2011.1697>
- Smolarz, K., Wołowicz, M., & Renault, T. (2005). Histology, cytogenetics and cytofluorimetry in diagnosis of neo-plasia in *Macoma balthica* (bivalvia, l.) from the southern baltic sea. *Caryologia*, 58(3), 212–219. <https://doi.org/10.1080/00087114.2005.10589453>
- Song, L., & Florea, L. (2015). Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads. *GigaScience* 2015 4:1, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S13742-015-0089-Y>
- Southam, C. M., Moore, A. E., & Rhoads, C. P. (1957). Homotransplantation of Human Cell Lines. *American Association for the Advancement of Science*, 125(3239), 158–160.
- St.-Jean, S. D., Stephens, R. E., Courtenay, S. C., & Reinisch, C. L. (2005). Detecting p53 family proteins in haemocytic leukemia cells of *Mytilus edulis* from Pictou Harbour, Nova Scotia, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62(9), 2055–2066. <https://doi.org/10.1139/f05-119>
- Stammnitz, M. R., Coorens, T. H. H., Gori, K. C., Hayes, D., Fu, B., Wang, J., ... Murchison, E. P. (2018). The Origins and Vulnerabilities of Two Transmissible Cancers in Tasmanian Devils. *Cancer Cell*, 33(4), 607-619.e15. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2018.03.013>
- Stephens, J., Everson, G., Elliott, C., Kam, I., Wachs, M., Haney, J., ... Franklin, W. (2000). Fatal transfer of malignant melanoma from multiorgan donor to four allograft recipients. *Transplantation*, 70(1), 232–236. Retrieved from <https://europepmc.org/article/med/10919612>
- Strakova, A., Leathlobhair, M. N., Wang, G. D., Yin, T. T., Airikkala-Otter, I., Allen, J. L., ... Murchison, E. P. (2016). Mitochondrial genetic diversity, selection and recombination in a canine transmissible cancer. *ELife*, 5(MAY2016). <https://doi.org/10.7554/elife.14552>
- Strakova, A., & Murchison, E. P. (2014). The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0168-9>
- Strakova, A., Nicholls, T. J., Baez-Ortega, A., Ní Leathlobhair, M., Sampson, A. T., Hughes, K., ... Murchison, E. P. (2020). Recurrent horizontal transfer identifies mitochondrial positive selection in a transmissible cancer. *Nature Communications*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16765-w>
- Sulak, M., Fong, L., Mika, K., Chigurupati, S., Yon, L., Mongan, N. P., ... Lynch, V. J. (2016). TP53 copy number expansion is associated with the evolution of increased body size and an enhanced DNA damage response in elephants. *ELife*, 5(September2016). <https://doi.org/10.7554/elife.11994>
- Sunila, I. (1987). Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvarminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Ann. Zool. Fennici*, 24, 55–69. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/279565817>
- Suquet, M., Kermoisan, G. de, Araya, R. G., Queau, I., Lebrun, L., Souchu, P. Le, & Mingant, C. (2009). Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources*, 22(1), 29–34.

<https://doi.org/10.1051/ALR/2009006>

- Sweet, M., Kirkham, N., Bendall, M., Currey, L., Bythell, J., & Heupel, M. (2012). Evidence of Melanoma in Wild Marine Fish Populations. *PLOS ONE*, 7(8), e41989. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0041989>
- Szathmáry, E., & Maynard Smith, J. (1995). The major evolutionary transitions. *Nature*, 374(6519), 227–232. <https://doi.org/10.1038/374227a0>
- Tanguy, M., Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Danger, J. M., & Siah, A. (2018). The immune response of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* LGP32 strain: A transcriptomic attempt at identifying molecular actors. *Fish & Shellfish Immunology*, 74, 268–280. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2017.12.038>
- Tasumi, S., & Vasta, G. R. (2007). A Galectin of Unique Domain Organization from Hemocytes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Is a Receptor for the Protistan Parasite *Perkinsus marinus*. *The Journal of Immunology*, 179(5), 3086–3098. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.179.5.3086>
- Theisen, B. F. (1973). The growth of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) from Disko and Thule district, Greenland. *Ophelia*, 12(1–2), 59–77.
- Theodor, J. L. (1970). Distinction between “Self” and “Not-Self” in lower invertebrates. *Nature*, 227(5259), 690–692. <https://doi.org/10.1038/227690A0>
- THIELTGES, D. W. (2007). Habitat and transmission – effect of tidal level and upstream host density on metacercarial load in an intertidal bivalve. *Parasitology*, 134(4), 599–605. <https://doi.org/10.1017/S003118200600165X>
- Thomas, F., Schmidt-Rhaesa, A., Martin, G., Manu, C., Durand, P., & Renaud, F. (2002). Do hairworms (Nematomorpha) manipulate the water seeking behaviour of their terrestrial hosts? *Journal of Evolutionary Biology*, 15(3), 356–361. <https://doi.org/10.1046/J.1420-9101.2002.00410.X>
- Thomas, L. (1982). On immunosurveillance in human cancer. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 55(3–4), 329. Retrieved from /pmc/articles/PMC2596448/?report=abstract
- Tissot, T. (2017). Une approche multi-échelle des processus écologiques et évolutifs impliqués dans le cancer. *Thèse*. Retrieved from <http://theses.fr/s152346>
- Tolar, J., & Neglia, J. P. (2003). Transplacental and other routes of cancer transmission between individuals. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 25(6), 430–434. <https://doi.org/10.1097/00043426-200306000-00002>
- Tolman, D., Wood, H. L., Skibinski, D. O. F., & Truebano, M. (2019). Differential immunity as a factor influencing mussel hybrid zone structure. *Marine Biology* 2019 166:12, 166(12), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S00227-019-3604-3>
- Tomasetti, C., Li, L., & Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*, 355(6331), 1330–1334. <https://doi.org/doi/10.1126/science.aaf9011>
- Tomasetti, C., & Vogelstein, B. (2015). Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*, 347(6217), 78–81. <https://doi.org/10.1126/science.1260825>

- Toubiana, M., Gerdol, M., Rosani, U., Pallavicini, A., Venier, P., & Roch, P. (2013). Toll-like receptors and MyD88 adaptors in *Mytilus*: Complete cds and gene expression levels. *Developmental & Comparative Immunology*, *40*(2), 158–166. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2013.02.006>
- Toubiana, M., Rosani, U., Giambelluca, S., Cammarata, M., Gerdol, M., Pallavicini, A., ... Roch, P. (2014). Toll signal transduction pathway in bivalves: Complete cds of intermediate elements and related gene transcription levels in hemocytes of immune stimulated *Mytilus galloprovincialis*. *Developmental & Comparative Immunology*, *45*(2), 300–312. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2014.03.021>
- Tremblay, R., Myrand, B., Sevigny, J. M., Blier, P., & Guderley, H. (1998). Bioenergetic and genetic parameters in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* (L.) to summer mortality. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *221*(1), 27–58. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(97\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00114-7)
- Ujvari, B., Beckmann, C., Biro, P. A., Arnal, A., Tasiemski, A., Massol, F., ... Thomas, F. (2016). Cancer and life-history traits: lessons from host-parasite interactions. *Parasitology*, *143*(5), 533–541. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000147>
- Ujvari, Beata, Gatenby, R. A., & Thomas, F. (2016). The evolutionary ecology of transmissible cancers. *Infection, Genetics and Evolution*, *39*, 293–303. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2016.02.005>
- Ulman, A., Ferrario, J., Occhpinti-Ambrogi, A., Arvanitidis, C., Bandi, A., Bertolino, M., ... Marchini, A. (2017). A massive update of non-indigenous species records in Mediterranean marinas. *PeerJ*, *5*(10), e3954. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.3954>
- Usheva, L. N., & Frolova, L. T. (2000). A connective tissue tumor in the mussel *Mytilus trossulus* from a polluted region of Nakhodka Bay, the Sea of Japan. *Ontogenez*, *31*(1), 63–70.
- Valenzano Menada, M., Moiola, M., Garaventa, A., Nozza, P., Foppiano, M., Trimarchi, N., & Fulcheri, E. (2010). Spontaneous regression of transplacental metastases from maternal melanoma in a newborn: Case report and review of the literature. *Melanoma Research*, *20*(6), 443–449. <https://doi.org/10.1097/CMR.0B013E32833FAF6A>
- Van De Peer, Y., Mizrachi, E., & Marchal, K. (2017). The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics*, *18*(7), 411–424. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.26>
- Vassilenko, E., & Baldwin, S. A. (2014). Using flow cytometry to detect haemic neoplasia in mussels (*Mytilus trossulus*) from the Pacific Coast of Southern British Columbia, Canada. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.02.002>
- Vazquez, N., Vázquez, N., & Cremonte, F. (2017). *Review of Parasites and Pathologies of the Main Bivalve Species of Commercial Interest of Argentina and Uruguay, Southwestern Atlantic Coast*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/319911579>
- Venier, P., Varotto, L., Rosani, U., Millino, C., Celegato, B., Bernante, F., ... Pallavicini, A. (2011). Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics* *2011 12:1*, *12*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-69>
- Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, *108*(2), 171–182. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00615-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00615-3)

- Villalba, A, Mourelle, S., Carballal, M., & López, C. (1997). Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rías of Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, 31(2), 127–139. <https://doi.org/10.3354/dao031127>
- Villalba, Antonio, Carballal, M. J., & López, C. (2001). Disseminated neoplasia and large foci indicating heavy haemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, 46(3), 213–216. <https://doi.org/10.3354/DAO046213>
- Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., ... Kwon, B. S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S185–S198. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2015.03.004>
- Vineis, P. (1994). Epidemiology of cancer from exposure to arylamines. *Environmental Health Perspectives*, 102(SUPPL. 6), 7–10. <https://doi.org/10.1289/EHP.94102S67>
- Vittecoq, M., Roche, B., Daoust, S. P., Ducasse, H., Missé, D., Abadie, J., ... Thomas, F. (2013). Cancer: A missing link in ecosystem functioning? *Trends in Ecology and Evolution*, 28(11), 628–635. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.07.005>
- Wang, L., Wang, L., Huang, M., Zhang, H., & Song, L. (2011). The immune role of C-type lectins in molluscs. *Invertebrate Survival Journal*, 8(2), 241–246. Retrieved from <https://www.isj.unimore.it/index.php/ISJ/article/view/253>
- Weinberg, J. R., Leavitt, D. F., Lancaster, B. A., & Capuzzo, J. M. D. (1997). Experimental Field Studies with *Mya arenaria* (Bivalvia) on the Induction and Effect of Hematopoietic Neoplasia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69(2), 183–194. <https://doi.org/10.1006/jipa.1996.4641>
- 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*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149(1), 168–175. <https://doi.org/10.1016/J.CBPB.2007.09.004>
- Yonemitsu, M. A., Giersch, R. M., Polo-Prieto, M., Hammel, M., Simon, A., Cremonte, F., ... Metzger, M. J. (2019). A single clonal lineage of transmissible cancer identified in two marine mussel species in South America and Europe. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.47788>
- Zardi, G. I., Nicastro, K. R., McQuaid, C. D., Jager, M. de, Koppel, J. van de, & Seuront, L. (2021). Density-Dependent and Species-Specific Effects on Self-Organization Modulate the Resistance of Mussel Bed Ecosystems to Hydrodynamic Stress. <https://doi.org/10.1086/713738>, 197(5), 615–623. <https://doi.org/10.1086/713738>
- Zhang, D., Ma, J., Jiang, J., Qiu, L., Zhu, C., Su, T., ... Jiang, S. (2009). Molecular characterization and expression analysis of lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Molecular Biology Reports* 2009 37:7, 37(7), 3335–3343. <https://doi.org/10.1007/S11033-009-9920-9>
- Zhang, S. M., Adema, C. M., Kepler, T. B., & Loker, E. S. (2004). Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science*, 305(5681), 251–254. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1088069>
- Zizzo, N., Tiscar, P., & Troncone, A. (1991). Neoplasia in mitili (*Mytilus galloprovincialis*). *BOLLETTINO SOCIETA' ITALIANA PATOLOGIA ITTICA*, 7, 19–21.

Zuzarte-Luís, V., & Mota, M. M. (2018). Parasite Sensing of Host Nutrients and Environmental Cues. *Cell Host & Microbe*, 23(6), 749–758. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2018.05.018>

Résumé : Biologie, écologie et évolution du cancer transmissible MtrBTN2 des moules *Mytilus sp.* Les cancers transmissibles sont des lignées cellulaires malignes qui ont évoluées la capacité de coloniser de nouveaux individus par transmission des cellules cancéreuses elles-mêmes. Considérés comme rares chez les vertébrés, avec seulement une lignée décrite chez le chien et deux chez le diable de Tasmanie, les découvertes depuis 2015 de cinq lignées dans plusieurs espèces de bivalves marins ont remis en question leur rareté dans ce groupe. Ces nouvelles formes parasitaires, qui ne ressemblent à aucune autre entité biologique, posent de nombreuses questions. Chez les bivalves, hormis la description des différentes lignées, peu de données étaient disponibles sur leur biologie, leur écologie et leur évolution. Ma thèse se focalise sur l'étude des cancers transmissibles des moules du genre *Mytilus*. En combinant plusieurs approches d'écologie, de biologie évolutive et de biologie fonctionnelle, mes travaux ont permis de décrire la distribution et la prévalence de ce cancer dans les populations de moules d'Europe, d'étudier l'histoire évolutive de ces lignées de cancer transmissible, ainsi que d'étudier les réponses des hôtes face à l'invasion par des cellules cancéreuses. Ainsi, nous avons pu montrer (1) que les populations des deux espèces de moules européennes *M. edulis* et *M. galloprovincialis* sont touchées par une même et unique lignée de cancer transmissible (MtrBTN2) qui a émergé initialement dans un hôte *M. trossulus*, qui est également retrouvée chez *M. chilensis* au Chili et chez *M. trossulus* en Mer du Japon, et qui est différente de la première lignée décrite initialement dans les populations *M. trossulus* de Colombie Britannique (MtrBTN1), (2) que la prévalence est globalement faible mais varie selon le fond génétique des hôtes et l'habitat, (3) que le trafic maritime semble créer des passerelles épidémiologiques entre les ports expliquant une plus forte prévalence dans ces habitats anthropisés, (4) que malgré une évolution clonale le MtrBTN2 est polymorphe ce qui suggère une histoire évolutive complexe et possiblement ancienne qui a mené à l'évolution d'au moins deux sous-lignées en Europe, (5) que la dynamique d'invasion intra-hôte par le cancer semble dépendre de l'individu receveur et de l'individu donneur dans le cadre d'infections expérimentales et (6) que cette invasion semble induire chez les individus receveurs une réponse immunitaire majoritairement humorale et un remodelage tissulaire associé à une réponse inflammatoire prolongée. Ces différents résultats permettent aujourd'hui de mieux comprendre la dynamique de ce système hôte-cancer si particulier et ouvrent de nombreuses perspectives. En plus d'être des entités biologiques uniques et intrigantes qui permettent d'étudier le cancer sous un angle évolutif original, les cancers transmissibles sont des modèles biologiques de prédilection pour de nombreuses questions fondamentales de la biologie.

Mots clés : cancer transmissible, complexe d'espèces *Mytilus edulis*, biologie évolutive, biologie fonctionnelle, écologie

Abstract : Biology, ecology and evolution of the MtrBTN2 transmissible cancer of *Mytilus sp.* mussels. Transmissible cancers are malignant cell lineages that have evolved the ability to colonize new individuals by transmission of the cancer cells themselves. Previously considered rare in vertebrates, with only one lineage described in the dog and two in the Tasmanian devil, the findings since 2015 of five lineages in several species of marine bivalves have questioned their rareness in this group. These new parasitic forms, which are unlike any other biological entity, raise many questions. In bivalves, except the descriptions of the different lineages, few data were available on their biology, ecology and evolution. My thesis focuses on the study of transmissible cancers in *Mytilus sp.* mussels. By combining several approaches of ecology, evolutionary biology and functional biology, my work allowed to describe the distribution and prevalence of this cancer in European mussel populations, to study the evolutionary history of these transmissible cancer lineages, as well as to study the host responses to invasion by cancer cells. Thus, we were able to show that (1) populations of the two European mussel species *M. edulis* and *M. galloprovincialis* are affected by a single transmissible cancer lineage (MtrBTN2) that initially emerged in a *M. trossulus* host, also found in *M. chilensis* in Chile and in *M. trossulus* in the Sea of Japan, which is different from the first lineage initially described in the *M. trossulus* populations in British Columbia (MtrBTN1), (2) the prevalence is globally low but varies among host genetic backgrounds and habitats, (3) maritime traffic seems to create epidemiological bridges between ports explaining a higher prevalence in these anthropized habitats, (4) despite a clonal evolution, MtrBTN2 is polymorphic which suggests a complex and possibly ancient evolutionary history that led to the evolution of at least two sub-lineages in Europe, (5) the dynamics of intra-host invasion by the cancer seem to depend on the recipient and the donor individual in the context of experimental infections and (6) this invasion seems to induce in the recipient individuals a predominantly humoral immune response and a tissue remodeling associated with a prolonged inflammatory response. These different results allow a better understanding of the dynamics of this very particular host-cancer system and open many perspectives. More than being unique and intriguing biological entities that allow us to study cancer from an original evolutionary viewpoint, transmissible cancers are ideal biological models for many fundamental questions in biology.

Key words : transmissible cancer, species complex *Mytilus edulis*, evolutionary biology, functional biology, ecology