



PROtéome de Stress chez une Espèce sentinelle : recherche de nouveaux marqueurs pour la surveillance environnementale

Aimie Le Saux

► To cite this version:

Aimie Le Saux. PROtéome de Stress chez une Espèce sentinelle : recherche de nouveaux marqueurs pour la surveillance environnementale. Interactions entre organismes. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMLH13 . tel-03896411

HAL Id: tel-03896411

<https://theses.hal.science/tel-03896411>

Submitted on 13 Dec 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 diplôme de doctorat

**Spécialité PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS -
INTERACTIONS**

Préparée au sein de l'Université Le Havre Normandie

**PROtéome de Stress chez une Espèce sentinelle : recherche de
nouveaux marqueurs pour la surveillance environnementale**

**Présentée et soutenue par
AIMIE LE SAUX**

**Thèse soutenue le 18/10/2022
devant le jury composé de**

MME FLORENCE GERET	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, INSTITUT NATIONAL UNIVERSITAIRE CHAMPOLLION	Rapporteur du jury
M. FRANK LE FOLL	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Le Havre Normandie	Membre du jury
MME CLAUDIA WIEGAND	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE RENNES 1	Membre du jury
MME ODILE TRESSE	CHARGE DE RECHERCHE (HDR), INST NAT RECHERCHE AGRONOMIQUE	Président du jury
MME BEATRICE ROCHER	MAÎTRE DE CONFERENCES (HDR), Université Le Havre Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par BEATRICE ROCHER (Stress environnementaux et
biosurveillance des milieux aquatiques)**



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Biologie des Organismes

Préparée au sein de l'Université LE HAVRE NORMANDIE

Etude du protéome de stress chez des bivalves sentinelles ; recherche de nouveaux marqueurs pour la surveillance environnementale

Présentée et soutenue par
Aimie LE SAUX

Thèse soutenue publiquement le 18 octobre 2022
devant le jury composé de

Pr Florence Gélet	Professeur des Universités, Université de Toulouse	Rapporteuse de thèse
Dr Odile Tresse	Chargée de Recherche - HDR INRAE, CHU de Nantes	Rapporteuse de thèse
Pr Claudia Wiegand	Professeur des Universités, Université de Rennes 1	Examinatrice de thèse
Pr Frank Le Foll	Professeur des Universités, Université Le Havre Normandie	Examineur de thèse
Dr Béatrice Rocher	Maître de Conférences-HDR, Université Le Havre Normandie	Directeur de thèse
Dr Florence Bultelle	Maître de Conférences, Université Le Havre Normandie	Chercheuse invitée

Thèse dirigée par Béatrice ROCHER

Sous l'encadrement scientifique de Florence BULTELE

Laboratoire : UMR-I 02 SEBIO - Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques



Normandie de
Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



Remerciements

Je souhaite tout d'abord témoigner de ma gratitude envers les membres de mon jury.

Merci à Florence G  ret, Professeur à l'Université de Toulouse, Odile Tresse, Chargée de Recherche - HDR à l'INRAE Nantes et Claudia Wiegand, Professeur à l'Université de Rennes, d'avoir accepté de rapporter mon travail de thèse.

Merci au Professeur Frank Le Foll de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Je tiens à remercier pour leur soutien les membres de mon Comité de Suivi Individuel de thèse, tout particulièrement Sandrine Pain-Devin et Michel Auffret ; leurs conseils m'ont accompagnée dans la progression de mon travail tout au long de ma thèse.

Merci    Béatrice Rocher d'avoir accepté de diriger mon travail de thèse, pour son aide précieuse et son regard éclairé sur mon travail. Sa prise de recul permanente aura permis de faire évoluer ma compréhension sur le sujet.

Merci    Florence Bultelle d'avoir été une encadrante scientifique exceptionnellement à l'écoute et critique à la fois. Tu as su me diriger dans la bonne direction en acceptant de me laisser développer mes propres idées.

Merci    Salima Aroua, Benoit Xuereb, Romain Coulaud, Tiphaine Monsinjon, Thomas Knigge et Céline Boulangé-Lecomte pour un accueil chaleureux au laboratoire, pour des conseils scientifiques, techniques (plongée, enfants...) et humains tout au long de ma thèse.

Merci    Apolline Chabenat, Marc Rollin, Jean-Baptiste Baudet et Sofia Soloperto pour leur accompagnement durant ma thèse, les moments de discussion et de remise en perspective lors des difficultés.

Merci    Aurélie Duflot, May  l   Burlion-Giorgi, Valérie Doudement, Nathalie Giusti et Agnès Poret pour le partage de connaissances, les conseils techniques.

Stéphanie Olivier, merci de m'avoir épaulée pendant les longues journées de manip, d'avoir toujours eu un moment pour discuter, écouter et rigoler et pour les précieux conseils autant scientifiques que personnels.

Merci à mes voisines de bureau Gersende Maugars et Géraldine Fazio pour les moments de détente, de discussions enfants et la bonne ambiance pendant la fin de ma thèse.

Merci aussi à Mathieu Paiola et à Housseem Chalgmi, mes voisins de bureau de début de thèse, pour les conseils et les moments de discussion/rigolade.

Merci à Romain Thouroude et Coline Auvray pour les relectures, conseils et moments de détente philosophiques. Merci à Aurélien Launay pour le soutien moral, les moments de débat et discussion et les conseils (même politiques).

Merci à Christophe Robe, Bruno Bisson, Fabien Baumann, Isabelle Bardin, Mireille Mathieu, Maxime Dautreme, Guillaume Le Goff, Jean-Pierre Pignata, Mickaël Dos Santos, Hervé, William et tous les membres d'Océaneaux76 pour les moments de rigolade en plongée et m'avoir laissé m'enthousiasmer sur les moules à chaque fois qu'on en voyait (vous voyez, c'est utile). Merci à Jean-Luc Lapel pour le soutien, les conseils et ta curiosité tout au long de ma thèse.

Merci à Katharine et Maddy Le Saux pour le soutien depuis le début, d'avoir cru en moi et les mots d'encouragements constants.

Merci à Nicolas Lapel de m'avoir soutenu pendant cette période, de m'avoir poussé quand c'était difficile, réconforté quand c'était interminable et de continuer à m'aimer même après ce périple. Merci d'exister et de m'avoir laissé intégrer ta famille.

Abréviations

2DE	2 Dimensional gel electrophoresis	DCE	Directive Cadre sur l'Eau
ACT	Actine	DCSMM	Directive Cadre Stratégie pour la Milieu Marin
AIP1	Actin interacting protein 1	DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
ALDH	Aldéhydes déshydrogénases	DLAT	Dihydrolipoamide S-Acetyltransferase
ALDO	Fructose-bisphosphate aldolase	DLD	Dihydrolipoamide Dehydrogenase
ARNseq	Séquençage de l'ARN	DNAJB11	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B11
ARP	Actin related protein	DTT	Dithiothreitol
ASR	Actin stress response	EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ATF6	Activating transcription factor 6	ENO	Enolase
ATP	Adenosine tri phosphate	ER	Endoplasmic reticulum
ATP5F1	Partie F1 du Complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale	ESI	Electrospray Ionisation
BAD	BCL2 associated agonist of cell death	EXPASY	Expert Protein Analysis System
BaP	Benzo-a-pyrène	FDR	False discovery rate
BCL-2	B-cell lymphoma 2	FKBP	FK506 binding protein
BDE	2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether	FKBP4	FKBP Prolyl Isomerase 4
BIM	BCL-2-like protein 11	FSCN	Fascin
BiP	Binding immunoglobulin protein	GAPDH	Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	GDP	Guanosine diphosphate
CAN3LH 3 jours d'exposition à un stress caniculaire (moules bleues du Havre)		GIEC	Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat
CAN3YP 3 jours d'exposition à un stress caniculaire (moules bleues de Yport)		GO	Gene ontology
CB153	14 jours d'exposition à un polychlorobiphényle type, le CB153	GRP	Glucose-Regulated Protein
CCT	Cytosolic chaperonin containing TCP-1	GSN	Gelsolin
Cd	Cadmium	GTP	Guanosine triphosphate
Cd7Bug 7 jours d'exposition (moules zébrées, D. polymorpha) au cadmium		HAP	Polycyclic aromatic hydrocarbons
Cd7Pol 7 jours d'exposition (moules quagga, D. r. bugensis) au cadmium		HAP14 14 jours d'exposition à un mélange d'hydrocarbures aromatiques polycycliques	
CFAP	Cilia- and flagella-associated protein	HAP7 7 jours d'exposition à un mélange d'hydrocarbures aromatiques polycycliques	
CFL	Cofilin	HCT116	Human colorectal carcinoma
CFU	Colony forming unit	Hg	Mercure
Cgig	Crassostrea gigas	HPLC	High-performance liquid chromatography
CHAPS	3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate	HSC	Heat cognate protein
CKB	Arginine kinase	HSP	Heat shock protein
CMR	Cancérigène, mutagène, reprotoxique	ID	Référence de la DAP
cov	Pourcentage de recouvrement de la séquence	IEF	Isoélectrofocalisation
CRTC	cAMP-regulated transcriptional co-activator	IRE1	Inositol requiring enzyme 1
CSR	Cellular Stress Response	IRP1	Iron responsive protein
Cu	Cuivre	JNK	c-Jun N-terminal kinase
Cvir	Crassostrea virginica	LC-MS/MS	Liquid chromatography associated with Mass spectrometry
Cys	Cystéine	LEMA	Loi sur L'Eau et les Milieux Aquatiques
D. p.	Dreissena polymorpha	LRP	Lung resistance-related protein
D. r.	Dreissena rostriformis	Lys, K	Lysine
D. r. b.	Dreissena rostriformis bugensis	M	Molaire (Mol/L)
Da	Dalton	M. e	Mytilus edulis
DAP	Differentially abundant protein	M. e. p.	Mytilus edulis platensis
		MAPK	Mitogen-activated protein kinase
		MDH	Malate dehydrogenase

Memer Mercenaria mercenaria
 Mgal Mytilus galloprovincialis
 Mgf Mascot generic format)
 Miyes Mizuhopecten yessoensis
 Mn Manganese
 MS Mass spectrometry
 MVP Major vault protein
 NAD nicotinamide adenine dinucleotide
 NADPH nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 NCBI National Center for Biotechnology Information
 NDUF Complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale
 NIH National institutes of Health
 obs. Observé
 P4HB Prolyl 4-hydroxylase subunit beta
 PAMM Plan d'Action pour le Milieu Marin
 PCB Polychlorobiphényle
 PDH Pyruvate deshydrogenase
 PDI Protein Disulfide Isomerase
 pep Nombre de peptides uniques
 PEPCCK Phosphoénolpyruvate carboxykinase
 PERK Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
 PES Protein expression signature
 PES Signatures d'expression protéique
 PGK1 Phosphoglycérate kinase 1
 pl Point Isoélectrique
 PM poids moléculaire
 PPIase Peptidyl-prolyl cis-trans isomérase
 ppm Partie par million
 PRDX Peroxiredoxin
 PSI Position Specific Iterated
 PSMA Proteasome 20S alpha
 PSMB Proteasome 20S beta
 PSMC3 26S protease regulatory subunit 6A
 PSMC4 26S proteasome regulatory subunit 6B
 PSMC5 26S protease regulatory subunit 8
 PSMC6 26S proteasome regulatory subunit 10B
 PSMD14 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14

PTM Modification post-traductionnelle
 QM Quagga Mussel, Dreissena rostriformis bugensis
 RE Reticulum Endoplasmique
 REACH Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
 ROCCH Réseau d'Observation de la Contamination Chimique
 ROS Reactive oxygen species
 Rpn protéine régulatrice du protéasome 19S non dépendante de l'ATP
 Rpt protéine régulatrice du protéasome 19S dépendante de l'ATP
 SDS dodécylsulfate de sodium
 sHSP Small heat shock protein
 SOD Superoxyde dismutase
STM21K 21 jours d'exposition à un stress thermique modéré (moules bleues des Kerguelen)
 TBBPA Tetrabromobisphenol-A
 TBC Tubulin folding cofactor
 TCP1 T-Complex Protein 1
 TCPP Tris(1-chloro-2-propyl) phosphate
 TDCPP Tris(1,3-dichloroisopropyl)phosphate
 TEKT Tektin
 TOF Time of flight
 TPI Triosephosphate isomerase
 TPM Tropomyosin
 TRiC TCP1 ring complex
 TUB Tubuline
 TXN Thioredoxine
 UniProt Universal protein resource
 UPR Unfolded protein response
 UPS Ubiquitine proteasome system
 VIM Filament intermédiaire
 WDR1 WD repeat containing protein 1/Actin-Interacting Protein 1
 XML Extensible markup language
 YWHA 14-3-3 Protein
 ZM Zebra mussel, Dreissena polymorpha
 Zn Zinc

Table des matières

Liste des tableaux	11
Liste des figures	13
Liste des annexes.....	15
Introduction	17
I. Préambule.....	19
II. Contexte écotoxicologique	20
II.1. Biosurveillance - aspects réglementaires.....	20
II.2. Biomarqueurs.....	23
II.2.1. Historique et définition	23
II.2.2. Limites de l'utilisation des biomarqueurs	24
II.2.3. Apport des omiques	24
III. Modèles biologiques	25
III.1. Phylogénie des mollusques bivalves.....	26
III.1.1. Lophotrochozoaires	26
III.1.2. Mollusques aquatiques	27
III.1.3. Bivalves	27
III.2. Présentation des 2 modèles biologiques utilisées.....	29
III.2.1. <i>Mytilus</i> sp	29
III.2.2. <i>Dreissena</i> sp	34
IV. Approche protéomique	41
IV.1. Les stratégies d'analyse protéomique	41
IV.1.1. Extraction	42
IV.1.2. Décomplexification.....	42
IV.1.3. Identification par spectrométrie de masse.....	42
IV.2. Etat de l'art protéomique <i>Mytilus</i> et <i>Dreissena</i>	43
V. Stress et réponses au stress.....	49
V.1. Le stress cellulaire	49
V.2. La réponse cellulaire au stress	49
Objectifs	54
Matériel et Méthodes.....	55
I. Matériel	57

I.1. Description des expérimentations	57
I.1.1. Expérimentations sur les moules bleues	57
I.1.2. Expérimentations sur les dreissènes.....	59
I.2. Description des analyses 2DE.....	59
I.2.1. Préparation des échantillons.....	59
I.2.2. IEF : première dimension.....	59
I.2.3. SDS PAGE : deuxième dimension	61
I.2.4. Coloration au bleu colloïdal	61
I.2.5. Analyse d'images et traitement statistique	61
I.3. Spectrométrie de masse.....	63
I.3.1. Techniques de spectrométrie de masse	63
I.3.2. Fichiers de masse	64
I.3.3. Banques de données pour l'analyse des spectres de masse	65
I.4. Récapitulatif des données disponibles	66
II. Méthodes	67
II.1. Procédure d'identification des spectres de masse.....	67
II.1.1. Mascot	67
II.1.2. X !Tandem.....	67
II.2. Autres outils d'analyses omiques	71
II.2.1. Outils génériques	71
II.2.2. Informations d'identité	72
II.2.3. Informations de structure	73
II.2.4. Les sites de clivages protéolytiques.....	76
II.2.5. Les interactions protéines-protéines	78
II.2.6. Les banques de données des multitâches.....	79
II.3. Synthèse de la procédure suivie.....	79
Résultats & Discussion.....	81
I. Criblage des données	83
II. Les DAP intervenant dans les processus de protection, de repliement et de dégradation...	88
II.1. Les DAP du stress thermique	89
II.1.1. Présentation des HSP.....	89
II.1.2. Mise en évidence dans le jeu de données	90
II.1.3. Confrontation avec la littérature	93
II.2. Les DAP appartenant au protéasome.....	94

II.2.1. Présentation du protéasome	94
II.2.2. Mise en évidence dans le jeu de données	95
II.2.3. Confrontation avec la littérature	96
II.3. Les DAP protéines disulfide isomérases	100
II.3.1 Présentation des PDI.....	99
II.3.2. Mise en évidence dans le jeu de données	100
II.3.3. Confrontation avec la littérature	101
II.4. Les DAP peptidyl-prolyl cis-trans isomérases	102
II.4.1. Présentation des peptidyl-prolyl cis-trans isomérases	102
II.4.2. Mise en évidence dans le jeu de données	103
II.4.3 Confrontation avec la littérature	103
II.5. Les DAP protéines 14-3-3	104
II.5.1. Présentation des protéines 14-3-3.....	104
II.5.2. Mise en évidence dans le jeu de données des protéines 14-3-3.....	106
II.5.3 Confrontation avec la littérature	109
II.6. Les DAP Major Vault Protéines	110
II.6.1. Présentation de la MVP	110
II.6.2. Mise en évidence dans le jeu de données	112
II.6.3. Comparaisons des séquences et structures des MVP	113
II.6.4 Confrontation avec la littérature MVP comme acteur dans la réponse au stress .	121
III. Les DAP intervenant dans les processus de détoxification et le système antioxydant.....	124
III.1. Les DAP aldéhydes déshydrogénases	124
III.2. Les DAP thiorédoxines/peroxyrédoxines.....	125
III.3. Les DAP superoxydes dismutases (SOD).....	127
III.3.1. Présentation des SOD.....	127
III.3.2. Mise en évidence dans le jeu de données	127
III.3.3. Comparaison des SOD entre les trois espèces étudiées	128
III.3.4 Confrontation avec la littérature.....	130
IV. Les DAP participant au cytosquelette et à son organisation.....	132
IV.1. Cas des microfilaments	133
IV.1.1. Présentation de l'actine	133
IV.1.2. Mise en évidence dans le jeu de données.....	133
IV.2. Cas des microtubules	136
IV.2.1. Présentation de la tubuline	136

IV.2.2. Mise en évidence dans le jeu de données.....	137
IV.3. Cas du TriC	139
IV.3.1. Présentation du complexe	139
IV.3.2. Mise en évidence dans le jeu de données.....	141
IV.4. Stabilité et dynamique du cytosquelette - Confrontation avec la littérature	141
V. Les DAP intervenant dans le métabolisme énergétique	146
V.1. Identification dans le jeu de données et mise en perspective	146
V.2. Focus sur les malate déshydrogénases (EC 1.1.1.37, MDH)	152
V.2.1. Présentation des MDH.....	152
V.2.2. Identifications des formes mitochondriales et cytosoliques.....	153
V. 2.3. Analyse des variations observées	155
V. 2.4. Confrontation avec la littérature	155
V.3. Focus sur les phosphoénolpyruvate carboxykinases (EC 4.1.1.32, PEPCK).....	156
V.3.1. Présentation des PEPCK	156
V.3.2. Identification de la PEPCK	158
V.3.3. Analyse des variations des PEPCK	162
V. 3.4. Confrontation avec la littérature	168
Discussion Générale.....	171
Conclusion - Perspectives	178
Bibliographie	184
Annexes	207
Annexe 1 : Characterization of Cu/Zn-SODs in sympatric species: A comparison of zebra and quagga mussels	209
Annexe 2 : New Insights into cellular Impacts of metals in aquatic animals	223
Résumé	242
Abstract	242

Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques des moules zébrées et quagga.....	40
Tableau 2 : Synthèse des études protéomiques sur les genres <i>Dreissena</i> et <i>Mytilus</i>	44
Tableau 3 : Synthèse des éléments matériels disponibles.	66
Tableau 4 : Nombre de peptides uniques obtenus en retour d'identification MS.	84
Tableau 5 : Nombre d'identifications obtenues chez les Mollusques	85
Tableau 6 : Familles de protéines récurrentes et nature des variations d'abondance	86
Tableau 7 : Occurrences des DAP appartenant aux protéines de choc thermique.	89
Tableau 8 : Occurrences des DAP appartenant au protéasome.	96
Tableau 9 : Occurrences des DAP protéines disulfide isomérases	101
Tableau 10 : Occurrences des DAP peptidyl-prolyl cis-trans isomérases	103
Tableau 11 : Occurrences des DAP protéines 14-3-3.....	106
Tableau 12 : Occurrences des DAP de la Major Vault Protéine	112
Tableau 13 : Occurrences des DAP aldéhydes déshydrogénases	125
Tableau 14 : Occurrences des DAP thiorédoxines/peroxyrédoxines.....	126
Tableau 15 : Occurrences des DAP de superoxyde dismutase	128
Tableau 16 : Occurrences des DAP actine.....	134
Tableau 17 : Occurrences des DAP associées à l'actine.....	135
Tableau 18 : Occurrences des DAP tubuline alpha	137
Tableau 19 : Occurrences des DAP tubuline bêta.....	138
Tableau 20 : Occurrences des DAP associées aux microtubules	139
Tableau 21 : Occurrences des DAP appartenant au complexe TCP1.....	141
Tableau 22 : Occurrences des DAP enzymes du métabolisme énergétique.....	147
Tableau 23 : Occurrences des malates déshydrogénases MDH	155
Tableau 24 : Occurrences des phosphoénolpyruvate carboxykinases PEPCK	163

Liste des figures

Figure 1 : Protection de l'eau et des milieux aquatiques : les textes clés en Europe depuis 2000.....	22
Figure 2 : Principales cibles et applications des études globales en écotoxicologie.....	25
Figure 3 : Eléments caractéristiques des lophotrochozoaires.	26
Figure 4 : Arbre phylogénétique simplifié des bivalves.	29
Figure 5 : Positionnement phylogénétique de l'espèce d'intérêt <i>Mytilus edulis</i>	29
Figure 6 : Répartition géographique des moules marines du genre <i>Mytilus</i>	31
Figure 7 : Cycle de vie de la moule bleue.....	32
Figure 8 : Positionnement phylogénétique des espèces d'intérêt <i>Dreissena polymorpha</i> et <i>Dreissena rostriformis bugensis</i>	34
Figure 9 : Aspect des coquilles de dreissènes.	35
Figure 10 : Zone d'expansion des dreissènes en Europe au cours du XIX ^e siècle.	36
Figure 11 : Localisation actuelle des deux espèces de dreissène.	37
Figure 12 : Les différences morphologiques des moules qu'au des eaux superficielles et des eaux profondes.	38
Figure 13 : Dommages associés à une surproduction de ROS sous l'effet de stress.	49
Figure 14 : Rôles des principales HSP.....	51
Figure 15 : Stratégie d'analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle.	60
Figure 16 : Les principales étapes du protocole d'électrophorèse bidimensionnelle.	62
Figure 17 : Rapport d'identification type généré par Mascot (version 2.0, Matrix Science).....	67
Figure 18 : Rapport d'identification type généré par X!Tandem (PAPPSO).....	70
Figure 19 : Formulaire de recherche BLASTP.....	72
Figure 20 : Exemple de résultat obtenu par BLASTP.....	73
Figure 21 : Exemple de résultat obtenu avec Clustal Omega 75	75
Figure 22 : Exemple de résultat obtenu par NetsurfP.....	76
Figure 23 : Exemple de résultat obtenu sur STRING.	77
Figure 24 : Pipeline des analyses effectuées à partir des données protéomiques.....	79
Figure 25 : String Interactions au sein de la catégorie CHAPERONNE.	88
Figure 26 : Exemple de résultat d'identification de la 14-3-3 epsilon chez <i>D. r. bugensis</i>	107
Figure 27 : Alignement par ClustalOmega de séquences 14-3-3 epsilon de mollusques bivalves.	108
Figure 28 : Alignement ClustalOmega des séquences peptidiques de 4 isoformes de 14-3-3 chez l'Homme.	109
Figure 29 : Représentation schématique d'une particule Vault.	111
Figure 30 : Exemple de localisation des protéoformes MVP sur les gels de 2DE.	113
Figure 31 : Alignement sous ClustalOmega des séquences peptidiques MVP chez <i>D. r. bugensis</i> (Db) et <i>D. polymorpha</i> (Dp).	115
Figure 32 : Alignement sous ClustalOmega de la séquence peptidique de la MVP de <i>M. edulis</i> (Me) avec celles de <i>D. r. bugensis</i> (Db) et de <i>D. polymorpha</i> (Dp)..	116
Figure 33 : Modélisation de la MVP de <i>Mytilus edulis</i> via Swissmodel.....	117
Figure 34 : Structure et organisation des MVP dans une particule Vault.....	117
Figure 35 : Analyse des structures secondaires de la MVP de <i>Mytilus edulis</i> par FFPred 118	118
Figure 36 : Mise en évidence des motifs MVP-repeats chez <i>Mytilus edulis</i>	118
Figure 37 : Schématisation des zones de recouvrement de la MVP.....	119
Figure 38 : DAP correspondant aux protéoformes entières de la MVP.....	120

Figure 39 : DAP correspondant aux protéoformes MVP légèrement plus courtes	120
Figure 40 : Formes fragmentaires de MVP.	121
Figure 41 : String Interactions au sein de la catégorie DETOXICATION & SYSTEME ANTIOXYDANT ..	124
Figure 42 : Alignement sous ClustalOmega des séquences peptidiques de SOD1 chez <i>D. polymorpha</i> et <i>D. r. bugensis</i>	129
Figure 43 : Alignement sous ClustalOmega de la séquence peptidique de SOD1 chez <i>M. edulis</i> avec celles de <i>D. polymorpha</i> et <i>D. r. bugensis</i>	129
Figure 44 : Alignement sous ClustalOmega des séquences peptidiques de SOD2 chez <i>D. r. bugensis</i> et <i>D. polymorpha</i>	129
Figure 45 : Alignement sous ClustalOmega de la séquence peptidique de SOD1 chez <i>M. edulis</i> avec celles de <i>D. polymorpha</i> et <i>D. r. bugensis</i>	130
Figure 46 : String Interactions au sein de la catégorie CYTOSQUELETTE.	132
Figure 47 : Positionnement du TriC dans le folding et l'assemblage de l'actine et de la tubuline.	140
Figure 48 : Protéofomes de tubuline bêta présentant une partie C-terminale plus courte	143
Figure 49 : String Interactions au sein de la catégorie METABOLIME ENERGETIQUE.	149
Figure 50 : Positionnement des DAP relevant du métabolisme énergétique.....	151
Figure 51 : Alignement par ClustalOmega de séquences peptidiques MDH1 et 2 de bivalves	154
Figure 52 : Focus sur les phosphoénolpyruvate carboxykinases.	157
Figure 53 : Alignement par ClustalOmega de séquences peptidiques PEPCK de bivalves.	159
Figure 54 : Alignement sous ClustalOmega des séquences peptidiques PEPCK chez <i>D. polymorpha</i> et <i>D. r. bugensis</i>	160
Figure 55 : Croisement des données d'identification et des peptides trypsiques spécifiques de <i>D. polymorpha</i>	161
Figure 56 : Croisement des données d'identification et des peptides trypsiques spécifiques de <i>D. r. bugensis</i>	162
Figure 57 : Couverture des séquences PEPCK chez la moule zébrée.....	165
Figure 58 : Couverture des séquences PEPCK chez la moule quagga..	166
Figure 59 : Structure des PEPCK et positionnement des protéofomes sur la séquence..	166
Figure 60 : Prédiction des structures secondaires de la séquence <i>D.r. bugensis</i> de PEPCK.	167
Figure 61 : Evolution du séquençage des génomes de bivalves, quelques exemples.	173
Figure 62 : Recherche bibliométrique Pubmed du nombre de publications mentionnant « panel » « biomarkers » et « protein » dans le titre et le résumé.	176
Figure 63 : Synthèse graphique des principaux résultats.	180

Liste des annexes

Annexe 1 : Characterization of Cu/Zn-SODs in sympatric species: A comparison of zebra and quagga mussels.....	209
Annexe 2 : New Insights into cellular Impacts of metals in aquatic animals	223

Introduction

I. Préambule

Les organismes aquatiques font face à des stress complexes liés aux fluctuations abiotiques classiques du milieu et à l'anthropisation, auxquels se superpose la problématique du changement climatique. Cela impose le développement de nouveaux outils de biosurveillance permettant de suivre la qualité des milieux aquatiques. Il s'agit d'augmenter la palette des biomarqueurs existants pour répondre aux attentes réglementaires et sociétales de la DCE et de la DCSMM, en s'appuyant sur l'utilisation de batteries de biomarqueurs plutôt que sur des marqueurs isolés.

La recherche de ces biomarqueurs nécessite en amont l'identification des mécanismes et des acteurs moléculaires associés à un stress donné. Afin de mettre en évidence les acteurs protéiques les plus fréquemment sollicités, les redondances dans les réponses moléculaires à différents stress d'espèces sentinelles bivalves ont été compilées dans un ensemble de données rassemblant l'analyse de protéomes branchiaux issues d'études indépendantes couvrant la période 2008-2018.

Le travail présenté ici est une méta-analyse de données de protéomique précédemment acquises au sein du laboratoire d'accueil. L'approche protéomique est une approche ouverte et globale qui cible directement les effecteurs cellulaires et reflète non seulement l'expression génique mais tient également compte des régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles.

La stratégie repose sur une ré-exploitation de données *in silico* et ne comporte pas d'approche expérimentale au sens classique du terme. Le jeu de données est issu de 8 expérimentations en condition de stress thermiques ou chimiques chez les bivalves. Pour chaque expérimentation, les variations d'abondance relatives entre conditions contrôle et exposée sont déjà établies et les spectres de masse disponibles. Le matériel utilisé dans ce travail de thèse inclut des ensembles d'analyse protéomique avec les images de gels, les tableurs d'analyse statistique, les fichiers de spectrométrie de masse.

L'hypothèse est que la méta-analyse fera apparaître des récurrences de réponse chez les moules quels que soient les stress imposés et mettra ainsi en évidence des acteurs communs. Ce set d'acteurs constitue une source de candidats dans la recherche de biomarqueurs pour la surveillance environnementale.

II. Contexte écotoxicologique

La pollution des milieux aquatiques représente l'un des principaux problèmes environnementaux du XXI^{ème} siècle. Les conséquences de l'urbanisation côtière, des activités industrielles et agricoles, la production et la consommation de substances chimiques ont entraîné le rejet de milliers de polluants dans les cours d'eau et, *in fine*, dans les milieux marins. A ces contaminations, se surajoutent désormais les effets du changement climatique. La dégradation des milieux aquatiques (acidification océanique, fonte des masses glacières arctiques et antarctiques, élévations du niveau de la mer, chute de la biodiversité) a généré une prise de conscience scientifique, politique et sociale de la fragilité et de l'importance des milieux aquatiques et de la nécessité de les protéger. Dès 2014 dans son 5^{ème} rapport, le GIEC (Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat) alertait sur les risques liés à l'anthropisation de ces milieux. En 2021, le GIEC concluait d'ailleurs que le climat change partout dans le monde et plus rapidement que prévu, ce qui se traduit par des événements climatiques extrêmes d'ores et déjà plus sévères et plus fréquents (IPCC, 2007, 2014, 2022).

II.1. Biosurveillance - aspects réglementaires

A l'échelle mondiale, la protection des ressources en eaux et des milieux aquatiques s'appuie sur l'élaboration de conventions multilatérales qui permettent de définir des objectifs et des stratégies communs aux pays signataires. A titre d'exemple, la Convention de Barcelone (1976) protège la zone méditerranéenne ; amendée en 1995, elle sera rebaptisée Convention pour la protection du milieu marin et du littoral de la Méditerranée. La Convention OSPAR ("Oslo-Paris", 1992) quant à elle, s'attache aux modalités de la coopération internationale pour la protection du milieu marin de l'Atlantique Nord-est. Enfin, la Convention de Stockholm (2001) cible plus spécifiquement certains polluants organiques persistants majeurs, souvent appelés "the dirty dozen" et interdit leur usage dans les pays signataires ; elle sera amendée en 2009 et la liste des composés proscrits élargie à cette occasion.

Les problématiques de gestion de l'eau et de restauration de sa qualité ont amené la France à adopter dès 1964 la loi sur l'eau qui organise la gestion de l'eau par bassin versant avec la création des agences de l'eau et des comités de bassin. Les principaux textes qui régulent aujourd'hui les usages de l'eau et la protection des milieux aquatiques sont portés par la Commission Européenne puis transposés en droit français. Ils concernent la préservation de l'eau et de l'environnement, la régulation de la production de substances chimiques ou encadrent le suivi sanitaire des espèces

aquatiques destinées à la consommation humaine (Eau France, <https://www.eaufrance.fr/les-principaux-textes-en-vigueur>). Les principales réglementations mises en œuvre depuis le début des années 2000 sont présentées dans la figure 1.

La Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2000/60/CE) est considérée comme un texte fondateur au niveau européen. Elle a été transposée en droit français en 2006 avec la loi sur L'Eau et les Milieux Aquatiques (LEMA, 2006-1772). La DCE a mis en place une politique globale pour atteindre un « bon état écologique et chimique » des masses d'eau en Europe et développer une utilisation durable et équitable des ressources en eau. Elle concerne les eaux souterraines et superficielles (eaux douces et eaux côtières) et s'appuie sur une gestion par grands bassins hydrographiques. Après une phase permettant d'établir un état des lieux pour chaque bassin, un schéma directeur d'aménagement et de gestion des eaux (SDAGE) est établi pour définir et prioriser les actions à mettre en place par cycle de 5 ans. La DCE ambitionne également de réduire les émissions et rejets de polluants dits prioritaires du fait de leur dangerosité. La liste des substances concernées comprenait initialement 33 molécules et est régulièrement révisée (45 composés actuellement).

En 2008, la Directive Cadre sur l'Eau est mise à jour (2008/105/CE) et impose de nouvelles normes de qualité environnementale pour les substances prioritaires et certains autres polluants. Elle fixe en outre 2027 comme date butoir pour atteindre le bon état des masses d'eau. La Directive Cadre Stratégie pour le Milieu marin 2008/56/CE (DCSMM) est mise en œuvre sur le même schéma que la DCE. Son objectif est d'amener les eaux marines à un bon état écologique à l'horizon 2026. Elle se décline à l'échelle de régions marines et comprend des étapes d'évaluation et de définition des objectifs environnementaux suivies par la mise en place de programmes de surveillance à travers un Plan d'Action pour le Milieu Marin (PAMM). La DCSMM s'appuie sur des réseaux de surveillance préexistants comme le Réseau d'Observation de la Contamination Chimique (ROCCH) de l'Ifremer qui a succédé au Réseau National d'Observation, RNO, fondé en 1974.

Les zones marines de production professionnelle de coquillages font l'objet d'un suivi sanitaire spécifique, initialement défini par la réglementation 2004/854/CE qui organise le contrôle des produits d'origine animale destinés à la consommation humaine. Ce texte a été renforcé par l'arrêté ministériel du 6 novembre 2013 (Légifrance, NOR : AGRG1322935A) qui intègre les évolutions réglementaires au niveau européen. Il impose la mise en place d'échantillonnages réguliers de bivalves avec suivi de la qualité microbiologique, recherche de phycotoxines et dosage des polluants. En outre, un inventaire des sources de pollution pour les différents sites a été créé. En France, le suivi est assuré par Ifremer à travers les réseaux de surveillance REMI (microbiologie), REPHYTOX (phycotoxines).

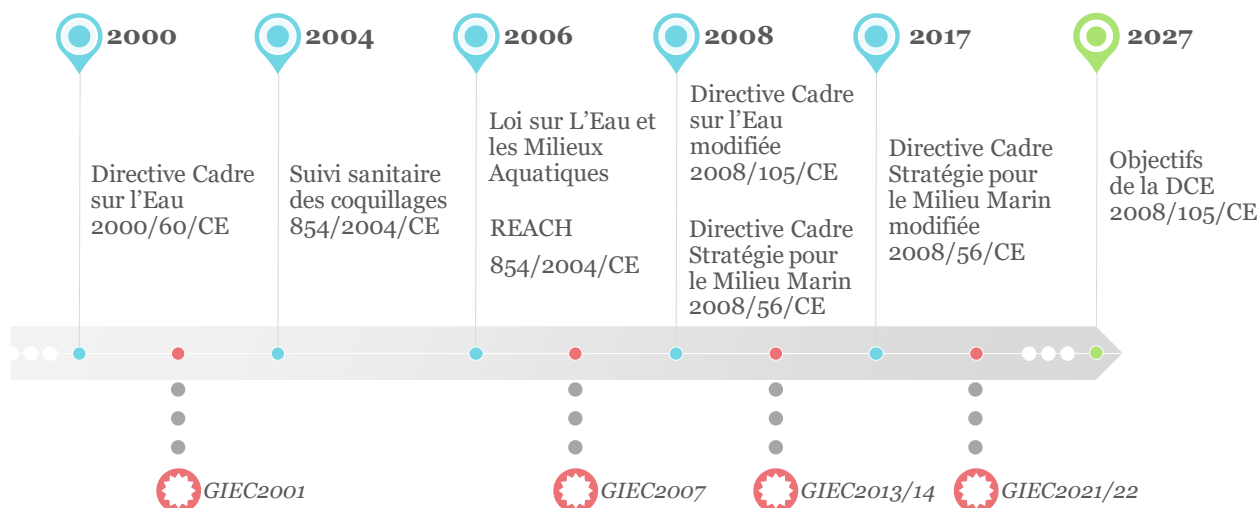


Figure 1 : Protection de l'eau et des milieux aquatiques : les textes clés en Europe depuis 2000.

Le règlement européen sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques (REACH, EC 1907/2006) a été promulgué en 2006 ; il est révisé tous les 5 ans. Il s'intéresse à la production et à l'usage des molécules de synthèse. En particulier, ce règlement impose de tester la dangerosité d'une substance chimique avant sa mise sur le marché en évaluant les dangers qu'elle représente pour la santé humaine et pour l'environnement, sa persistance et sa capacité de bioaccumulation. Le règlement REACH prévoit aussi le remplacement des produits les plus dangereux lorsque cela est possible. Les molécules concernées dites "substances extrêmes préoccupantes" sont de nature très diverse. Leur classement peut être lié à leur caractère CMR (cancérogène, mutagène ou reprotoxique), à leur capacité à exercer d'autres effets délétères sévères sur les organismes (par exemple, les perturbateurs endocriniens) ou encore à leur faible dégradation qui favorise leur persistance dans les écosystèmes et les organismes.

Enfin, la définition du "bon état" s'appuie sur des données chimiques et écologiques mais n'intègre pas l'évaluation de l'état de santé du biote via des données écotoxicologiques. Un consortium européen s'est mis en place pour proposer des compléments à la réglementation via l'utilisation de méthodes innovantes de surveillance biologique. Cela s'est traduit par la publication de rapports et recommandations visant à développer et évaluer des outils intégrateurs basés sur les effets ("Effect-based Methods") en surveillance environnementale (Office Français de la Biodiversité, <https://professionnels.ofb.fr/fr/node/1474>).

II.2. Biomarqueurs

II.2.1. Historique et définition

L'origine des biomarqueurs vient de la cancérologie autour des années 1970 même si le terme de marqueur biologique existe depuis les années 1940 (Mundkur 1949). Plusieurs définitions des biomarqueurs très différentes dans leur signification et leur terminologie existent. Aux Etats-Unis, le National Institute of Health a défini un biomarqueur comme "une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme une indication de processus biologiques normaux, de processus pathogènes ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique" (Biomarkers Definitions Working Group. 2001). En médecine, un biomarqueur est interprété comme un outil de diagnostic ou de pronostic d'une pathologie. En écotoxicologie, les biomarqueurs sont des changements biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementaux chez les organismes exposés aux contaminants et sont, de ce fait, le reflet de perturbations environnementales en lien avec la contamination (Depledge et Fossi 1994 ; Amiard-Triquet, Amiard, et Rainbow 2013 ; Lafontaine et coll. 2000). Les biomarqueurs utilisés en surveillance environnementale ont d'abord été classés en marqueurs d'exposition, d'effet et de sensibilité. Le biomarqueur d'exposition indique qu'un organisme a été soumis à une contamination et que le polluant a pénétré dans l'organisme. Le biomarqueur d'effet donne une information supplémentaire : la molécule a pénétré dans l'organisme et y a exercé un effet toxique. Enfin le biomarqueur de sensibilité repose sur la réaction particulière d'une espèce vis-à-vis d'un contaminant. Il en va ainsi de l'imposex décrit en réponse à la pollution aux organoétains chez certains gastéropodes aquatiques. La difficulté à discriminer la nature des événements moléculaires observés explique l'abandon progressif de cette nomenclature. Par exemple, l'acétylcholine estérase s'est retrouvée à la fois biomarqueur d'effet et d'exposition. Actuellement, les biomarqueurs sont classés en deux grandes catégories : biomarqueurs de défense et biomarqueurs de dommages (Garric, Morin, et Vincent-Hubert 2010). Sans être exhaustif, parmi les biomarqueurs de défense se trouvent les enzymes de biotransformation, les enzymes antioxydantes, les métallothionéines. La lipoperoxydation, les adduits et cassures de l'ADN sont eux des biomarqueurs types de dommages. De nombreuses réponses biologiques mesurées à différents niveaux d'organisation ont été et continuent d'être proposées dans la littérature scientifique comme des biomarqueurs de surveillance des environnements aquatiques et terrestres (Amiard-Triquet 2019 ; Amiard-Triquet, Amiard, et Rainbow 2013 ; Arrighetti et coll. 2019 ; Catteau et coll. 2019). Certains sont utilisés en routine dans les approches réglementaires de biosurveillance (Milinkovitch et coll. 2019).

II.2.2. Limites de l'utilisation des biomarqueurs

La principale difficulté de l'utilisation des biomarqueurs est l'interférence des variations naturelles qu'elles soient saisonnières ou abiotiques avec le paramètre suivi. Les milieux aquatiques sont effectivement caractérisés par de nombreux changements de condition (pluviométrie, marées, températures, disponibilités en nourriture, turbidité, etc) (McCarty, Power, et Munkittrick 2002a). Il est important de définir ce qui est normal pour un organisme donné en fonction de son histoire de vie et de son contexte environnemental. Les profils moléculaires changent au cours du développement et diffèrent selon les stades de vie. Les événements moléculaires d'un stade de développement peuvent ne pas être détectables à d'autres stades. La dynamique de ces changements et leur relation avec les fonctionnements classiques de la reproduction, du comportement et du développement doivent être établies pour chaque organisme dans le contexte spécifique approprié (Milinkovitch et coll. 2019).

II.2.3. Apport des omiques

Le terme de omique décrit l'étude globale d'éléments cellulaires comme le génome, le transcriptome ou le protéome, ou plus récemment le métabolome et l'épigénome (figure 2). La fin des années 1990 a été marquée par l'essor du séquençage des génomes et donc le développement de la génomique. L'exemple emblématique est la première publication du génome humain en 2004 qui révèle l'existence de 21 306 gènes (Willyard 2018). L'acquisition des données génomiques a favorisé l'étude des variations phénotypiques aux niveaux transcriptomique et protéomique. Ces stratégies, symétriques et complémentaires, visent à décrire et comprendre la dynamique des processus biologiques. De fait, les études croisées de protéomique et de transcriptomique apportent des éléments enrichissants à la connaissance du vivant (Buccitelli et Selbach 2020). Les omiques reposent sur l'utilisation de méthodes à haut débit qui permettent de générer rapidement des quantités très importantes de données brutes dont le traitement nécessite l'usage d'outils bioinformatiques et statistiques. *In fine*, ces approches ouvertes amènent une meilleure compréhension de la nature et du fonctionnement cellulaire et physiologique et sont une source de nouveaux candidats biomarqueurs (Gonzalez et Pierron 2015). C'est dans cette perspective que ce travail de thèse a été mené.

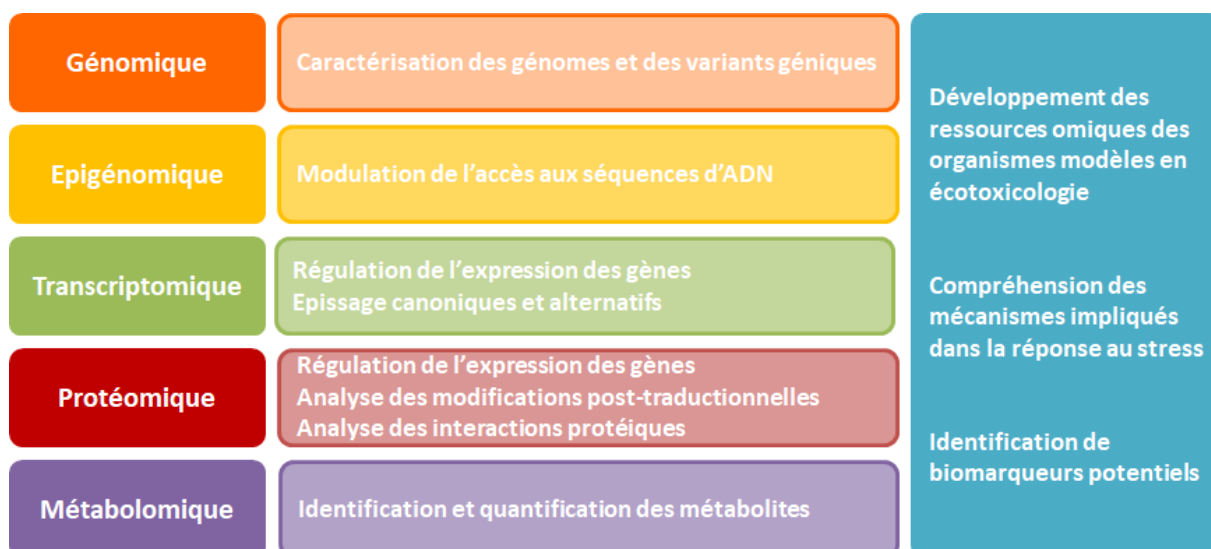


Figure 2 : Principales cibles et applications des études globales en écotoxicologie.

III. Modèles biologiques

Un organisme modèle pour être sélectionné comme espèce modèle doit présenter la plupart des caractéristiques suivantes (Amiard-Triquet 2019; Beiras 2018) :

- Une facilité d'identification
- Un échantillonnage facile avec une disponibilité pour la capture toute l'année
- Une nature sédentaire pour la représentativité de la pollution sur le site de collecte
- Une taille de population suffisante pour garantir le maintien de la population
- Une longévité de plusieurs années avec une capacité de bioaccumulation
- Une large aire de distribution
- Une biologie et écologie bien connues
- Une représentativité vis-à-vis de leur environnement

Pour les milieux aquatiques, différents groupes phylogénétiques sont classiquement utilisés : vertébrés, invertébrés, algues. Les moules marines de la famille des Mytilidae et les moules d'eau douce de la famille des Dreissenidae répondent aux critères dans la mesure où elles présentent une large répartition géographique, un mode de vie sédentaire, une relative résistance aux contaminants,

et une importante capacité de bioaccumulation. Ces espèces sont des mollusques bivalves appartenant au groupe phylogénétique des lophotrochozoaires. Elles sont phylogénétiquement éloignées des modèles biologiques vertébrés mais la compréhension de leurs mécanismes de survie et d'adaptation en réponse au stress constitue une source d'outils potentiels pour la surveillance des milieux aquatiques. En raison de leur grande adaptabilité à la salinité et à la température, et de leur grande tolérance aux changements environnementaux soudains, les mollusques bivalves ont été largement utilisés comme espèces modèles dans de nombreux programmes de biosurveillance (Beyer et coll. 2017 ; Viarengo et coll. 2007).

III.1. Phylogénie des mollusques bivalves

Les invertébrés aquatiques comprennent plus de 20 phyla, représentent probablement plus de 30% de toutes les espèces animales et possèdent une plasticité structurale et des propriétés régénératrices remarquables. A ce jour, leurs physiologies et métabolismes ne restent que partiellement connus.

III.1.1. Lophotrochozoaires

Les lophotrochozoaires comprennent les plathelminthes, les bryozoaires, les brachiopodes, les annélides, les mollusques (Halanych, 2016). Les lophotrochozoaires couvrent un large éventail de formes corporelles, de cycles de vie, de modes de développement, d'habitats et de comportements, et comprennent à la fois les plus petits et les plus grands invertébrés vivants, depuis les minuscules loricifères (e.g. *Pliciloricus enigmaticus*) qui mesurent environ un dixième de millimètre, jusqu'aux gigantesques calmars des grands fonds dont le corps est long de plusieurs mètres. Ce clade complexe est caractérisé par la présence d'au moins l'un des deux éléments suivants : la larve trochophore et/ou la structure lophophore (figure 3).

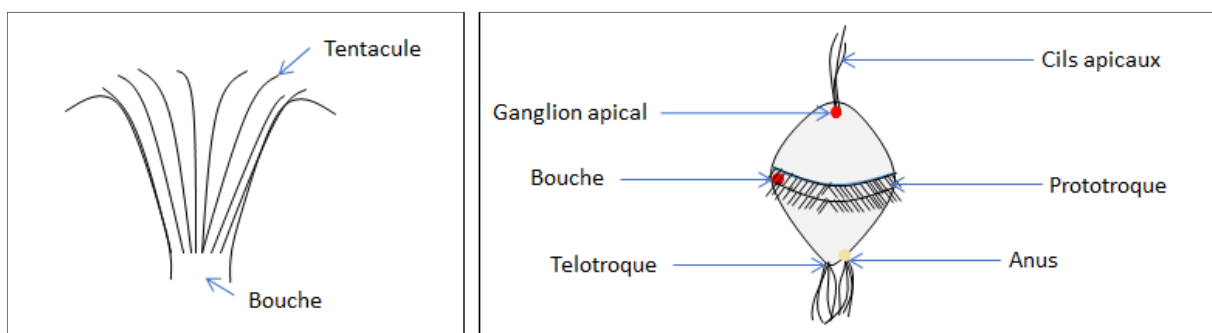


Figure 3 : Eléments caractéristiques des lophotrochozoaires. Schématisation du lophophore (à gauche) et de la larve trochophore (à droite).

La trochophore est la forme larvaire qui suit les étapes de clivage en spirale du zygote. Elle présente une forme de toupie ciliée associée à un mode de vie planctonique. La structure lophophore est une couronne de tentacules ciliées impliquée dans l'alimentation (Adoutte et coll. 2000).

III.1.2. Mollusques aquatiques

Dans sa définition la plus simple, un mollusque peut être défini "comme tout invertébré à corps mou du phylum Mollusca, généralement entièrement ou partiellement enfermé dans une coquille de carbonate de calcium sécrétée par un manteau recouvrant le corps" (Salvini-Plawen, Luitfried v. 2021). Ce phylum constitue le deuxième plus grand embranchement d'invertébrés après les arthropodes (Giribet et Wheeler 2005). Il présente une radiation évolutive complexe et regroupe de ce fait des animaux avec des morphologies, anatomies et physiologies très diversifiées, y compris dans sa composante aquatique (environ 95 000 espèces). Cette diversité se retrouve à travers les habitats (dulcicoles ou marins), les régimes alimentaires (phytophages, zoophages, nécrophages, omnivores), les modes d'alimentation (filtreurs, brouteurs, prédateurs...) ou de locomotion (fixés, enfouis, rampants ou même nageurs) (Haszprunar et Wanninger 2012).

Cette extrême diversité rend difficile la compréhension de l'évolution des espèces au sein de cet embranchement et leur classification reste un sujet polémique. La combinaison des approches classiques et des connaissances génomiques a permis de proposer des éléments de classification consensuels en 2 taxons et 8 classes mais la relation phylogénétique entre les différentes classes est toujours discutée (Sigwart et coll. 2021 ; Wanninger et Wollesen 2019). Le phylum des mollusques présente une dichotomie qui dessine deux taxons monophylétiques : les aculifères, dits mollusques à spicule, et les conchifères dérivés d'un ancêtre à coquille unique. Les aculifères sont des organismes marins. Ils comprennent les polyplacophores (à coquille multiple) ou chitons, caractérisés par leurs coquilles articulées dotées de systèmes sensoriels, les caudofoveata et les solénogastres (classiquement regroupés sous le terme d'aplapophore - sans coquille) qui présentent une allure vermiforme typique associée respectivement à des modes de vie libres (ou épigés) ou endogés. Les conchifères regroupent les monoplacophores, surtout connus sous forme fossile, les scaphopodes avec leur coquille tubulaire et enfin, les gastéropodes (aquatiques ou terrestres), les céphalopodes et les bivalves, les 3 classes les mieux connues des mollusques.

III.1.3. Bivalves

Les bivalves sont généralement des mollusques à symétrie bilatérale dans lesquels le manteau renferme les branchies (cténidies), le pied et la masse viscérale, et sécrète une coquille sous la forme de deux valves latérales, articulées dorsalement. Par rapport à d'autres mollusques, le corps du bivalve

est comprimé latéralement et élargi dorso-ventralement, adapté par exemple à l'enfouissement dans les sédiments. L'enceinte formée par les valves de la coquille protège les tissus mous. Une autre caractéristique de cette classe est un grand pied musculaire qui est généralement utilisé pour la locomotion (Gosling 2003). La taille des bivalves varie de 1 mm pour les plus petits à plus de 1,5 m pour le bénitier géant (*Kuphus polythalamia*), le plus grand bivalve actuel (Distel et coll. 2017). Les structures sensorielles externes sont concentrées sur les marges du manteau où elles sont exposées à l'environnement lorsque les valves s'ouvrent. Les bivalves sont capables de déceler des changements d'environnement et de répondre à des stimuli, indiquant une capacité à détecter et intégrer des événements avec un système nerveux central et périphérique peu développé (Luitfried 2009). La plupart des bivalves sont marins et se rencontrent à toutes les profondeurs dans ou sur pratiquement tous les substrats. Les bivalves sont présents dans l'ensemble des biotopes aquatiques, les différentes espèces couvrent des gradients de salinité et de température importants. Ces animaux se retrouvent en zones littorales et estuariennes ainsi qu'en eau douce, ce qui démontre qu'ils supportent des conditions environnementales très variables (Abele et coll., 2009). Certains bivalves ont une affinité avec les récifs coralliens. Les récifs de l'Indo-Pacifique sont l'habitat des palourdes géantes, *Tridacna gigas* et des huîtres *Isognomon isognomon*. Des phénomènes de symbiose sont possibles entre le corail vivant et le bivalve foreur, certaines espèces s'associant à un seul corail (Hédouin et coll. 2009). Les mollusques bivalves sont également des modèles utilisés dans des études sur la sénescence. Ainsi, la palourde *Arctica islandica* est actuellement le métazoaire avec la plus grande longévité connue, plus de 400 ans (Wanamaker et coll. 2008). Les propriétés de régénération, la permanence de la capacité reproductive et le fait que ces animaux grandissent tout au long de leur vie sous-tendent une capacité des cellules à limiter la sénescence (Blier et coll. 2017).

La classification des mollusques bivalves a évolué depuis les identifications fondées sur des observations morphologiques telles que la forme des charnières ou le type de branchies. L'intégration des données moléculaires a dessiné une nouvelle classification disponible via le World Register of Marine Species. Bouchet et coll. (2010) distinguent deux sous-classes : les protobranches et les autolamellibranches (figure 4). Ces derniers, comportant des bivalves d'eau douce et marins, se caractérisent par la présence de larges cténidies (branchies) impliquées dans l'alimentation et la respiration.

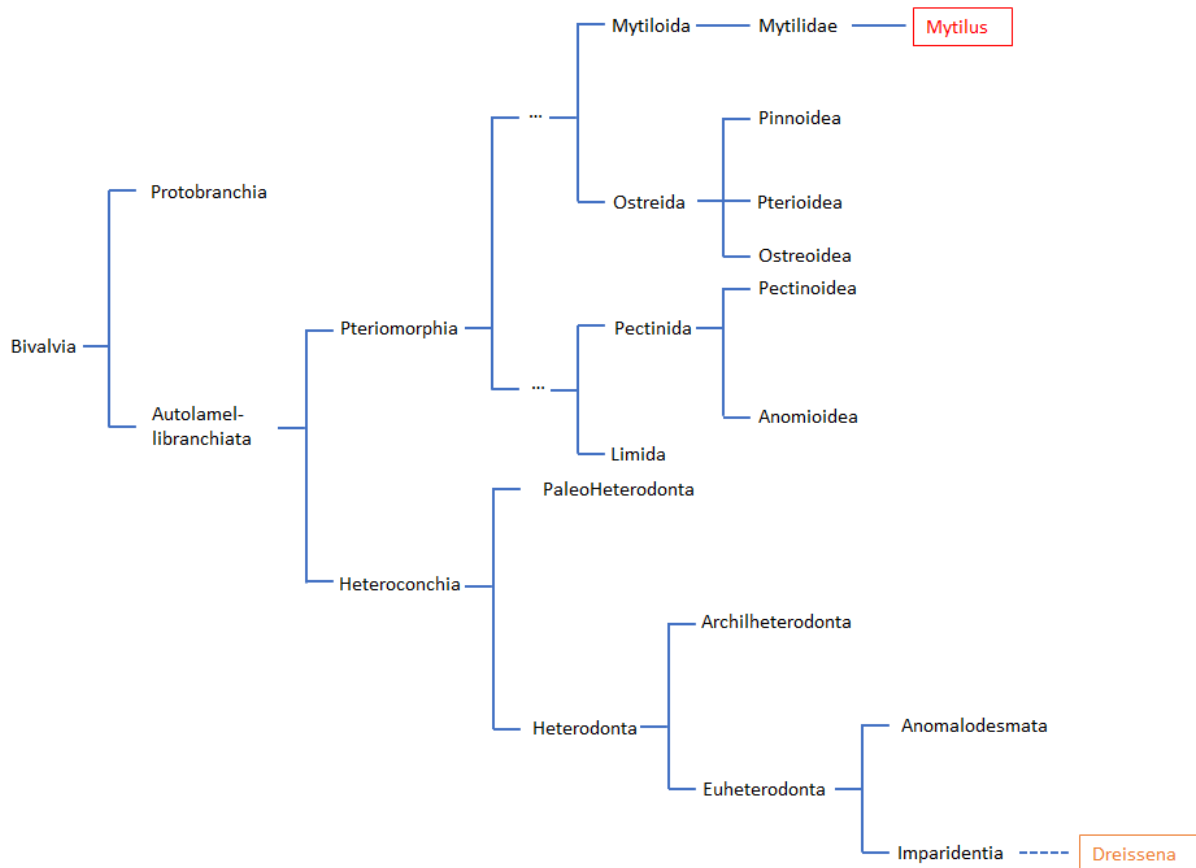


Figure 4 : Arbre phylogénétique simplifié des bivalves. *Mytilus* et *Dreissena* sont des autolamellibranches.

La sous-classe Autolamellibranchiata a produit la principale diversité en termes de genres et d'espèces. Ce succès est probablement lié au fait que l'appareil de filtration branchiale s'adapte à de nombreux modes de vie (sédentaire ou mobile, avec enfouissement ou forage), et à différents modes d'alimentation (filtration, alimentation par dépôt). Les autolamellibranches sont organisées en 2 clades Pteriomorpha et Heteroconchia contenant les deux genres étudiés dans cette thèse (Giribet et Wheeler 2005). En dépit de leur éloignement apparent sur l'arbre présenté en figure 4, les moules marines et dulcicoles sont relativement proches d'un point de vue phylogénétique, avec un mode de vie filtreur et sédentaire.

III.2. Présentation des 2 modèles biologiques utilisés

III.2.1. *Mytilus* sp

Mytilus sp fait partie des ptériomorphes, la sous-classe la plus riche en espèces avec environ 1500 espèces recensées. Ce groupe, entièrement marin, comprend 5 ordres des bivalves et 23 familles

(figure 5). Parmi ces familles se trouvent les pétoncles (Pectinidae incluant les superfamilles Pectinoidea et Anomioidea), les huîtres (Ostreida incluant les superfamilles Pinnoidea, Pterioidea et Ostreidae), les huîtres perlières (Pteriidae) et les moules (Mytilidae, Mytilida incluant la superfamille Mytiloidea) (Combosch et coll. 2017).

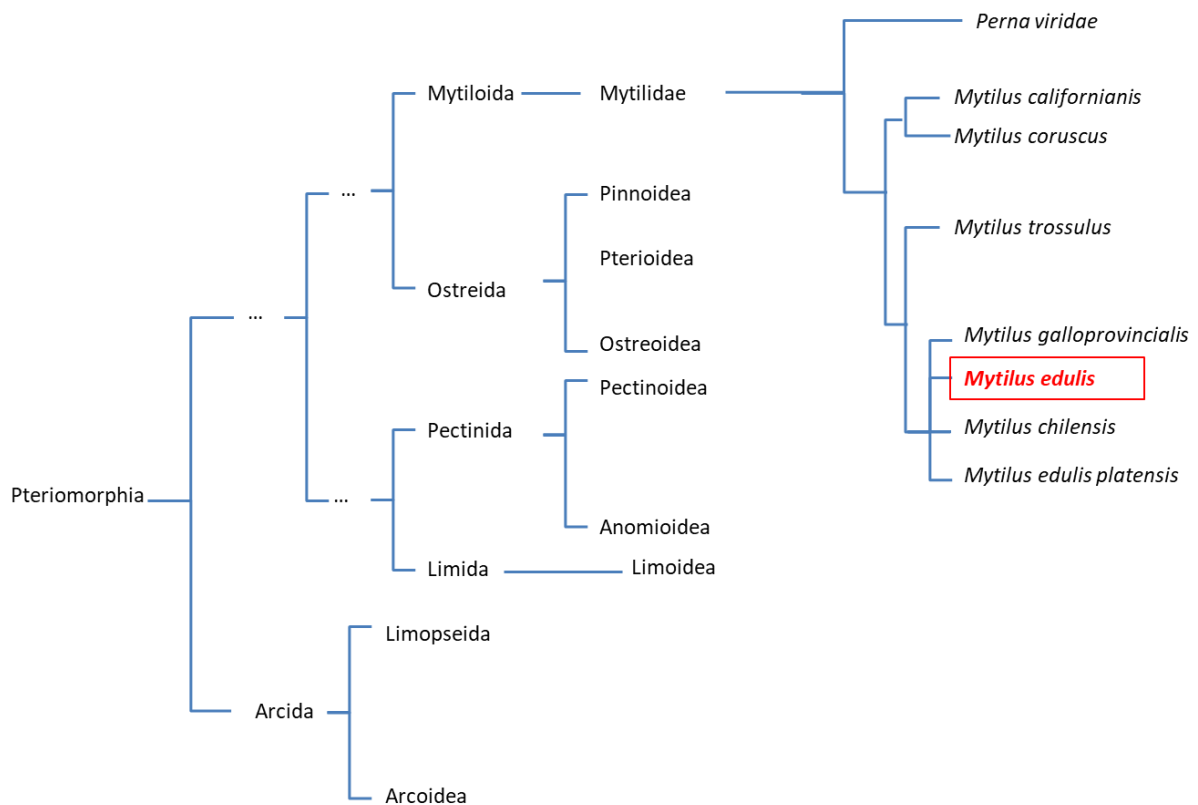


Figure 5 : Positionnement phylogénétique de l'espèce d'intérêt *Mytilus edulis* dans le clade des Ptéromorpha (d'après Lemer et coll. 2016 ; Sharma et coll. 2012).

Concernant les Mytilidae, les analyses phylogénétiques des séquences d'ADNr 18S et 28S ont indiqué que cette famille est monophylétique (Samadi et coll. 2007). L'ordre des Mytiloidea se compose d'environ 250 espèces. Il est caractérisé par une coquille symétrique, arrondie, allongée (ou triangulaire selon le mode de vie), avec une charnière édentée, des cténidies filibranches, un bord du manteau bien délimité, un pied locomoteur et une glande byssogène pour l'ancrage au support.

II.2.1.1. Distribution géographique et mode de vie

Le genre *Mytilus* compte cinq espèces présentes dans l'hémisphère Nord (*M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*, *M. coruscus*, et *M. californianus* sur les côtes états-uniennes) et une espèce supplémentaire *M. chilensis* présente dans l'hémisphère Sud (Gosling 2003). A cela s'ajoute la sous-espèce *Mytilus edulis platensis* sur la façade atlantique de l'Amérique du sud et dans la zone

antarctique (îles Kerguelen) (Gérard et coll. 2008). Les 3 espèces sœurs, *M. edulis* (L. 1758), *M. trossulus* (Gould, 1850) et *M. galloprovincialis* (Lamarck, 1819) forment le complexe *Mytilus edulis*. Elles sont étroitement apparentées avec le même nombre de paires de chromosomes (14). Elles peuvent se reproduire entre elles avec une descendance hybride fertile.

Les moules bleues tolèrent un large éventail de conditions environnementales (salinité, température, temps d'émersion) mais il existe des différences inter-espèces. Ainsi, *M. trossulus* est plus tolérante que *M. edulis* aux conditions de basse température et de faible salinité (Wenne et coll. 2016). En revanche, l'espèce apparue le plus récemment avec une spéciation en mer méditerranée, *M. galloprovincialis*, est plus tolérante aux températures élevées. Elle supporte de plus une large gamme de salinité. Cette adaptabilité peut lui conférer un avantage sur les espèces endogènes ; elle est d'ailleurs considérée comme invasive aux Etats-Unis, sur certaines côtes africaines et sur les côtes de la mer du Nord et de la Manche, notamment dans les grands ports maritimes comme Le Havre (Braby 2006). La cohabitation avec *M. edulis* mène localement à des zones d'hybridation (figure 6).

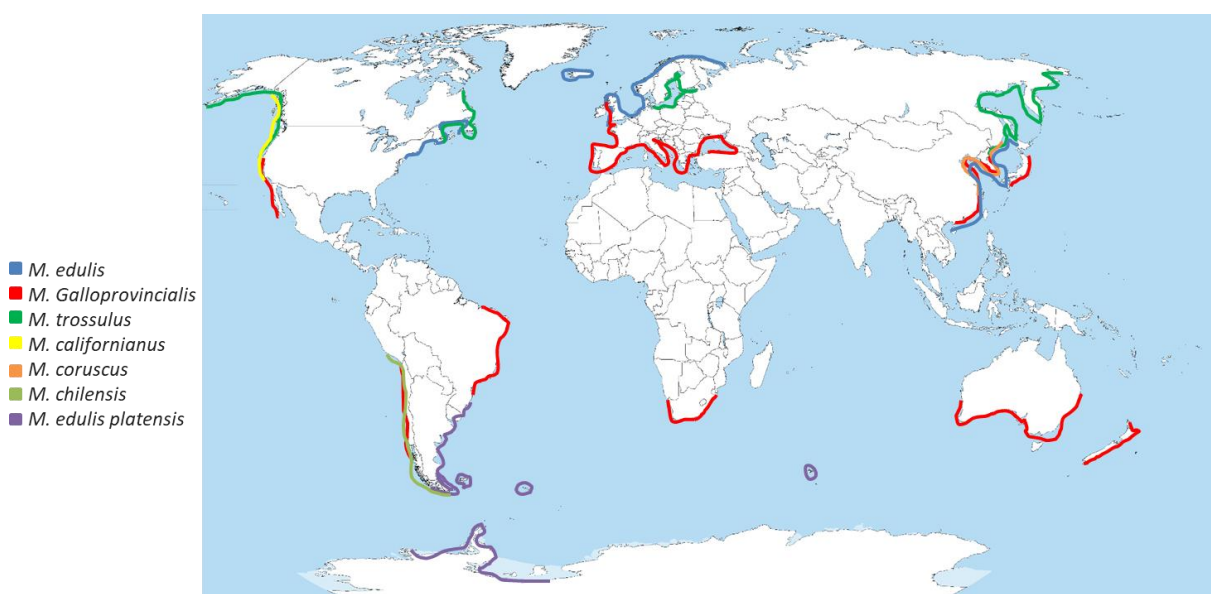


Figure 6 : Répartition géographique des moules marines du genre *Mytilus*. Les répartitions générales des moules ont été compilées à partir de différentes sources (Anand et Vardhanan 2020 ; Daguin, Bonhomme, et Borsa 2001 ; Gaitán-Espitia et coll. 2016 ; Sabirov 2014 ; Tobke et coll. 2021).

M. edulis résiste à des températures extérieures allant jusqu'à -10°C (Williams 1970) et ne survit pas longtemps au-delà de 32°C (Clark, Peck, et Thyrring 2021). C'est une espèce filtreuse vivant regroupée en moulières accrochées sur un substrat solide. L'espèce est présente en zone subtidale comme intertidale où elle est soumise à des périodes d'émersion répétées. Elle atteint sa maturité sexuelle après un an et demi et sa reproduction a lieu principalement au printemps, lorsque la température de l'eau atteint environ 12°C. *Mytilus* présente une stratégie de reproduction de type r,

c'est à dire qu'elle présente un taux de reproduction élevé mais que la descendance subit une mortalité forte. Les sexes sont séparés et les gonades se développent au moment de la reproduction sous forme diffuse dans le manteau. La maturation des gonades commence en octobre pour les moules bleues de l'hémisphère Nord. La ponte est synchronisée et entraîne le rejet des deux types de gamètes dans la mer pour une fertilisation externe. Une gamétogenèse secondaire a souvent lieu plus tard dans la saison (généralement fin août / début septembre), en fonction, entre autres, de la disponibilité en nourriture et de la température (Sukhotin et coll. 2007).

L'œuf fécondé se développe en larve trochophore nageuse, puis en une larve véligère (40-60 microns) à coquille (figure 7). Les véligères présentent une morphologie en forme D (larve D), et restent planctoniques jusqu'à atteindre les 250 µm en environ 4 semaines. La véligère est entourée d'un vélum cilié qui lui permet de nager et de piéger de minuscules particules de nourriture.

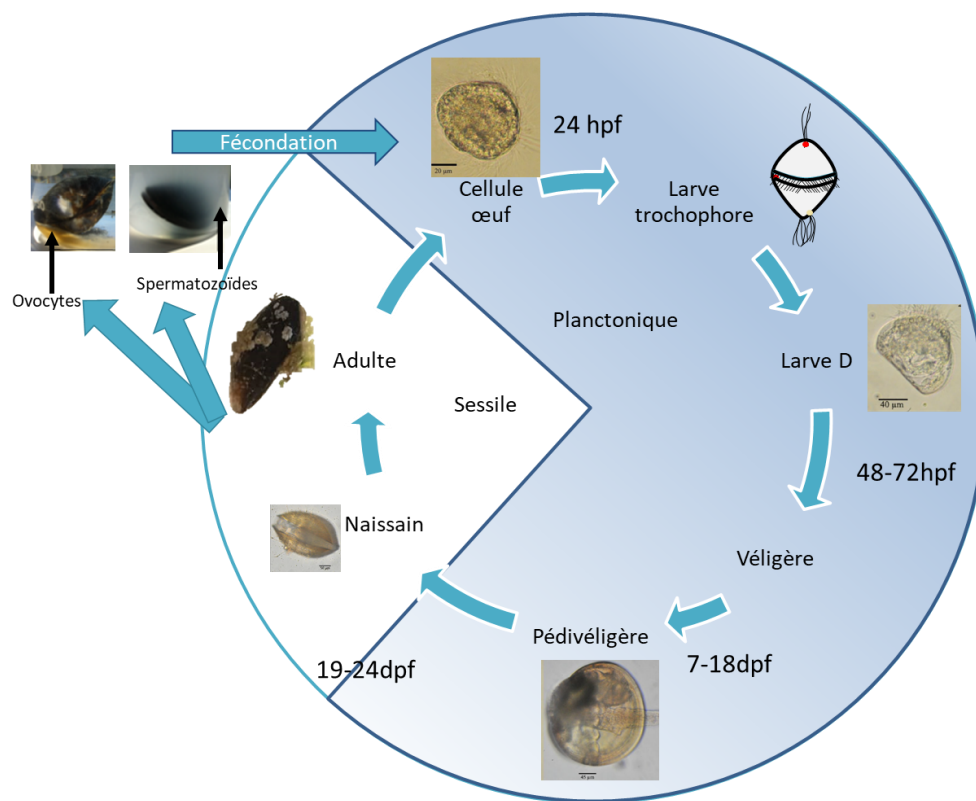


Figure 7 : Cycle de vie de la moule bleue. Au cours du développement larvaire (en bleu), le zygote passe par les stades trochophore, puis D, véligère et pédivéligère. Après fixation sur le substrat, la croissance des moules juvéniles se poursuit jusqu'à l'obtention d'adultes matures (photographies UMR-I 02 SEBIO).

Après la période planctonique, la véligère descend en zone benthique, où elle se métamorphose en pédivéligère : le vélum disparaît, le pied se développe et la pédivéligère sécrète généralement un ou deux fils de byssus pour un début de fixation. A ce stade, les cténidies se développent. Le pied

permet de ramper à la recherche d'un substrat approprié pour commencer une vie benthique fixée. Une moule bleue atteint environ 7 mm en 2 mois. Dans des conditions favorables, *M. edulis* peut atteindre 10 cm et vivre plus de 10 ans bien que les spécimens de plus de 8 cm soient rares dans le milieu naturel (Sukhotin et coll., 2007).

II.2.1.2. *Mytilus edulis* en écotoxicologie

Dans la mesure où la contamination dans les bivalves reflète celle dans les eaux, en particulier estuariennes, la moule bleue est un bivalve très utilisé dans les programmes de biosurveillance du monde entier ce qui en fait un organisme modèle pour les études écotoxicologiques et écophysiologiques des zones côtières (Beyer et coll. 2017 ; Beiras 2018). Le programme de surveillance Mussel Watch initié en 1975 repose sur « une analyse systématique et répétée de paramètres de qualité de l'environnement (par exemple, les concentrations de contaminants) sur des moules sauvages, cultivées, sur un ensemble d'emplacements géographiques définis (stations mytilicoles) et sur une période de plusieurs années » (Goldberg 1975 ; Goldberg et coll. 1978). A titre d'exemple, chez les moules prélevées aux États-Unis entre 1976 et 1988, les concentrations moyennes de zinc variaient de 67 à 3700 mg.kg⁻¹ (poids sec)(Gad 2014). L'utilisation des moules bleues pour une évaluation écotoxicologique est aussi appliquée lors d'accidents environnementaux. Par exemple, une évaluation multidisciplinaire de différents paramètres biologiques, parmi lesquels les effets génotoxiques, a été réalisée le long de la côte de la Ligurie lors d'un accident pétrolier en 1991 ou du naufrage du Costa Concordia au large de la Toscane en 2012 (Bolognesi et Degan 2001 ; Regoli et coll. 2014).

Ainsi, les moules bleues sont parmi les sentinelles les plus fréquemment utilisées dans la surveillance de l'environnement marin au niveau mondial. Les études se poursuivent, en particulier pour caractériser la toxicocinétique de certains contaminants ou encore analyser l'accumulation des contaminants nanométriques et mieux comprendre leurs effets (Beyer et coll. 2017). Les moules bleues tolèrent généralement assez bien la manipulation et conviennent donc aux expériences de transplantation en cage sur les sites marins. Le recours à l'encagement de moules est un complément à l'utilisation de moules sauvages car il offre la possibilité de contrôler des facteurs expérimentaux dans les études de terrain. L'approche par encagement de moules a gagné en popularité ces dernières années et de plus en plus d'études écotoxicologiques utilisent la transplantation de moules (Beyer et coll. 2017).

III.2.2. *Dreissena* sp

Les bivalves d'eau douce comptent au moins 19 familles réparties en trois sous-classes. L'infraclasse Heteroconchia est la sous-classe la plus large, la plus riche en biodiversité et comprend certains bivalves économiquement importants telles les palourdes vénérides (figure 8). L'ordre des Euhétérodontes regroupe la majorité des bivalves dulcicoles et se caractérise par une coquille mince, une charnière avec dentition, un petit pied. Il comprend environ 400 espèces avec des organismes fouisseurs, comme les palourdes d'eau douce (Corbiculae) mais aussi des bivalves sessiles tels que *Dreissena*.

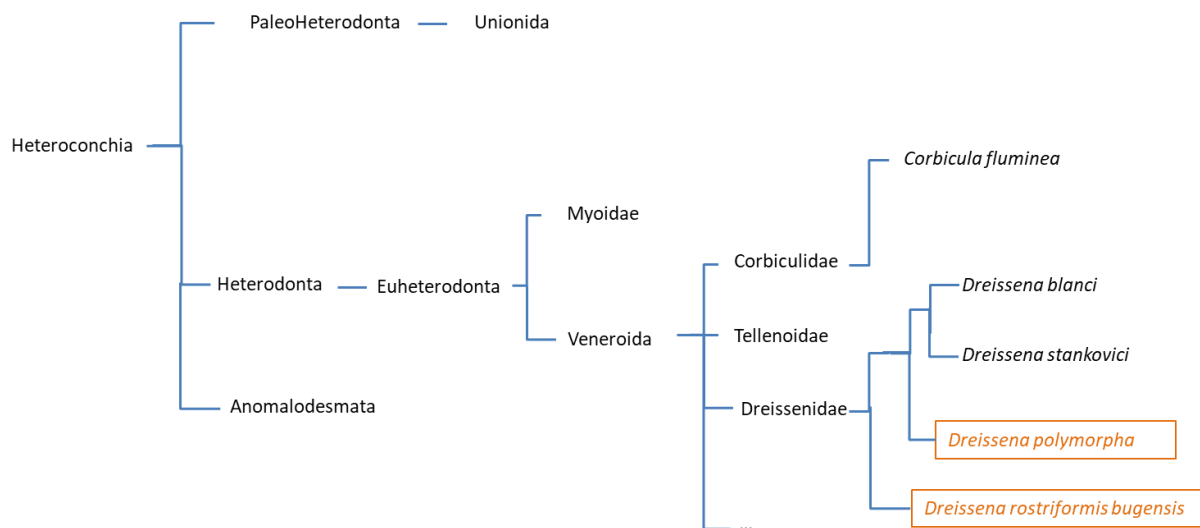


Figure 8 : Positionnement phylogénétique des espèces d'intérêt *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis*. Réalisé d'après les informations combinées de Combosch et coll. (2017), Giribet et Distel (2003) et Giribet et Wheeler (2005).

Dreissena polymorpha, la moule zébrée et *Dreissena rostriformis bugensis*, la moule quagga sont les deux espèces du genre *Dreissena* étudiées ici (figure 9). Selon les travaux effectués sur les ARN ribosomiaux et sur le gène de la cytochrome oxydase I, les moules zébrées auraient divergé des moules quagga il y a environ 13 à 18 millions d'années (Stepien, Hubers, et Skidmore 1999 ; Gelembiuk, May, et Lee 2006).

La moule zébrée est une petite moule d'eau douce nommée d'après le motif rayé de sa coquille et qui peut mesurer jusqu'à 2.5 cm (Mackie 1991). Le revêtement extérieur de la coquille (ou périostracum) est généralement de couleur beige clair avec une série distincte de larges bandes transversales foncées qui peuvent être lisses ou en forme de zigzag. Les motifs de couleur peuvent varier au point de n'avoir que des coquilles de couleur foncée ou claire sans rayures. L'aspect polymorphe de l'espèce a conduit à déterminer son nom latin (*Dreissena polymorpha*) et le zèbre son nom vernaculaire. Les moules quagga sont morphologiquement proches des moules zébrées avec

également des motifs en bandes dont la couleur varie considérablement. Le nom quagga vient d'une espèce éteinte qui ressemble fortement à un zèbre, le quagga (*Equus quagga quagga*). Les moules quagga ont généralement des anneaux concentriques sombres sur la coquille et sont de couleur plus pâle près de la charnière.



Figure 9 : Aspect des coquilles de dreissènes. A gauche, une moule zébrée, *D. polymorpha* et à droite une moule quagga, *D. r. bugensis* (photographies : UMR-I 02 SEBIO).

II.2.2.1. Distribution géographique et mode de vie

- ***Dreissena polymorpha***

D. polymorpha est originaire des rivières de l'Oural et sa propagation est documentée depuis le XVIII^e siècle (Karatayev 2015). Suite à la création de canaux connectant des bassins, la dispersion de *D. polymorpha* a explosé, même si une dispersion lente se produisait probablement naturellement depuis l'Holocène (Orlova et coll. 2005). Son arrivée en Mer Caspienne au cours du XX^e siècle a favorisé l'extension progressive de *D. polymorpha* jusqu'en Europe centrale puis occidentale (figure 10). Par exemple, les moules zébrées ont été observées et identifiées pour la première fois à Rotterdam en 1826, à Hambourg en 1830 et à Copenhague en 1840. De même, sa présence a été enregistrée dans la Tamise (Royaume-Uni), à partir de 1824 (Aldridge, Elliott, et Moggridge 2004). En 1997, elle est observée dans le fleuve Shannon, en Irlande, qu'elle semble avoir envahi depuis les quais de Limerick. En 2001, elle est découverte en Espagne où elle remonte actuellement l'Èbre. Parallèlement, les moules zébrées ont commencé à apparaître sur d'autres continents. Elles sont ainsi décrites en Amérique du Nord depuis le milieu des années 1980 et elles s'y sont propagées à une vitesse exceptionnelle, de sorte que l'espèce occupe maintenant tout le bassin du Mississippi et une grande partie des grands lacs du centre et de l'Est des États-Unis (Johnson, 1996) (figure 11).

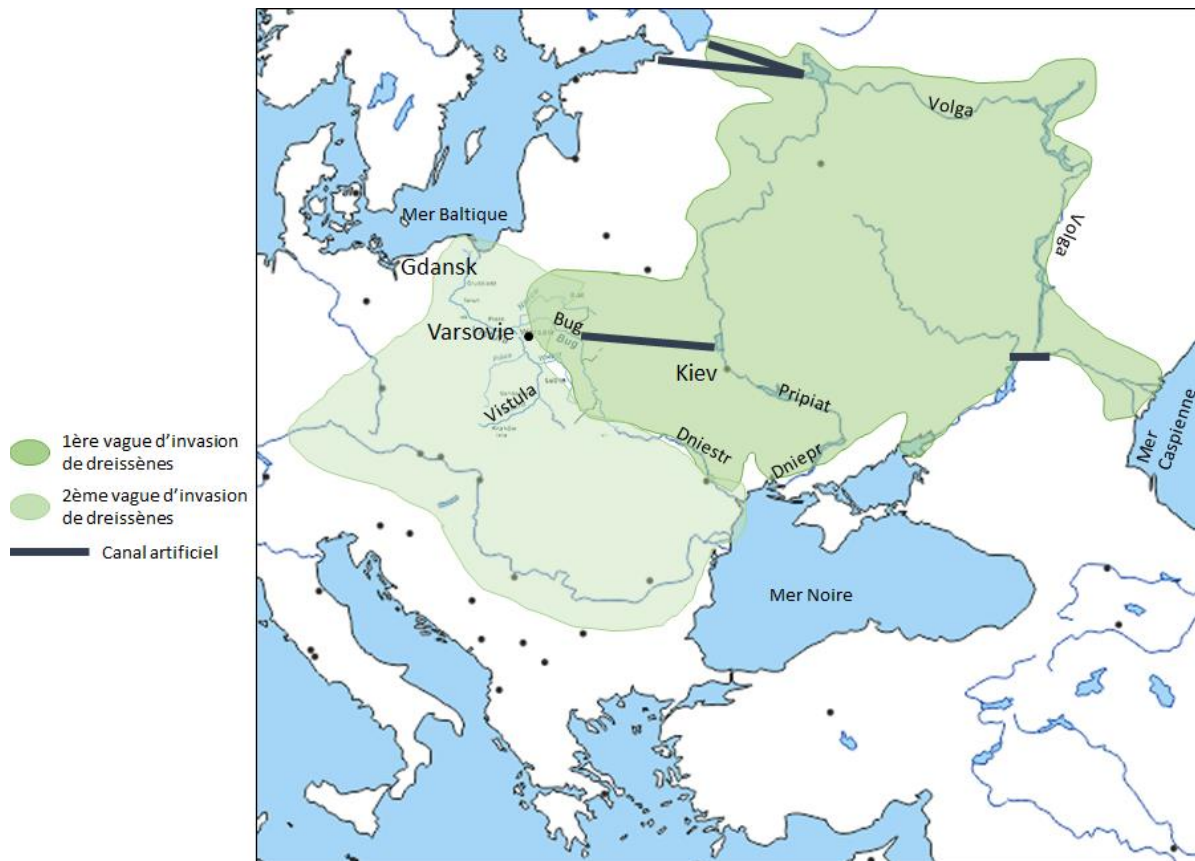


Figure 10 : Zone d'expansion des dreissenés en Europe au cours du XIX^e siècle. Réalisé d'après les informations combinées de Benson & Raikow (2008), bij de Vaate et Beisel (2011), Peyer, Hermanson, et Lee (2010), Prié et Fruget (2017) et Vanderploeg et coll. (2002).

- ***Dreissena rostriformis bugensis***

La moule quagga a été signalée pour la première fois dans le lac Dniepr-Bug (Ukraine), dans le bassin de la mer Noire, et décrite sous le nom de *D. rostriformis*. Une seconde espèce, nommée *D. bugensis*, a été décrite dans la rivière bug à la même époque. Bien qu'il ait été suggéré que les espèces *D. rostriformis* et *D. bugensis* soient distinctes en raison de différences de coloration, de morphologie, de taille adulte maximale et de tolérance à la salinité, des analyses moléculaires ont révélé uniquement des différences génétiques mineures entre la *D. rostriformis* de la mer Caspienne et la *D. bugensis* de la mer Noire, de sorte que le nom *Dreissena bugensis rostriformis* (Andrusov 1897) est celui retenu pour la moule quagga (Therriault et coll. 2004).

La présence de *D. r. bugensis* s'est limitée à sa zone native jusque dans les années 1940 (bij de Vaate et Beisel 2011 ; Karatayev 2015). Entre les années 1940 et 1990, son aire de répartition s'est étendue, au nord de la mer Noire, dans le fleuve Dniepr, la rivière Pripiat, et le Dniestr. La rivière Pripiat est une composante du corridor d'Europe centrale reliant les mers Noire et Baltique via le fleuve Dniepr. La colonisation est d'abord lente : *D.r. bugensis* a été signalée pour la première fois dans la

Volga en 1992 soit 40 ans après l'ouverture du canal Don-Volga , qui relie les régions de Ponto-Azov et de la Caspienne (Antonov 1993 ; Orlova et coll. 2005). La vitesse de colonisation des moules quagga augmente fortement à partir des années 1980, dépassant celle des moules zébrées au XIX^e siècle en Europe. Au début des années 1990, elle atteint la Volga et est observée à Moscow en 2003 (Karatayev 2015) (figure 11).

En Europe occidentale, la première observation de la moule quagga a été faite en 2006 dans le Hollandsch Diep, un tronçon du Rhin situé aux Pays-Bas, et laisse envisager une colonisation probable vers 2004 (Marescaux et coll. 2012). En 2007, l'espèce a été trouvée dans la rivière Main, un affluent de la partie amont du Rhin. En 2014, elle a été signalée pour la première fois dans la lagune de Szczecin (Pologne). Il s'agissait du premier signalement de l'espèce dans le bassin versant de la mer Baltique (Woźniczka et coll. 2016). Dans le Rhin et dans la Meuse, où elle a été détectée dès 2007, une expansion rapide a été observée. La moule quagga est ainsi récemment apparue dans de nombreux cours d'eau français tels que l'Oise (Prié et Fruget 2017). Bij de Vaate et Beisel (2011) avancent l'hypothèse que la moule quagga est arrivée en France par la Moselle, un affluent rive gauche du Rhin.

En Amérique du Nord, les moules quagga sont apparues pour la première fois au milieu des années 1980 et se sont propagées de façon exponentielle aux États-Unis. Cette expansion étatsunienne reste moins rapide que celle de *D. polymorpha* qui a colonisé plus de zones d'eau douce au total à ce jour (figure 11). Il semblerait que la moule quagga supporte moins la salinité que la moule zébrée ce qui expliquerait son expansion géographique moins forte. Cependant une meilleure tolérance à l'hypoxie l'amènerait à dominer davantage des zones plus profondes en eaux douces (Karatayev 2015).

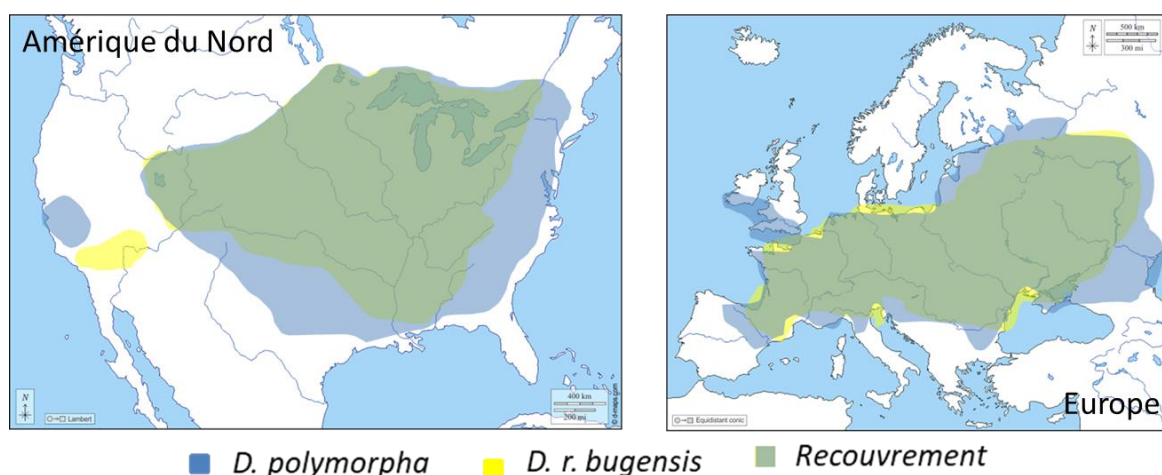


Figure 11 : Localisation actuelle des deux espèces de dreissène. Zones d'expansion de *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* de nos jours aux Amériques du Nord (à gauche) et en Europe (à droite) établie d'après plusieurs sources (Benson & Raikow 2008 ; bij de Vaate et Beisel 2011 ; Peyer, Hermanson, et Lee 2010 ; Prié et Fruget 2017; Vanderploeg et coll. 2002). En bleu, les zones occupées par *D. polymorpha*, en jaune, les zones colonisées par *D. r. bugensis* et en vert, les zones où les 2 espèces sont présentes.

- **Cycle de vie**

Les dreissènes sont des bivalves, et comme tous les organismes de cette classe, leur corps est donc enfermé dans une coquille à deux valves, sécrétée par le manteau. L'espèce est présente en zone dulcicole (lacs, rivières...) et peut coloniser une zone depuis la surface jusqu'au substratum de fond grâce à sa capacité à se fixer sur de nombreux substrats. La reproduction de la dreissène est semblable à celle des bivalves marins. L'ovogenèse de la dreissène se produit en automne, les œufs se développant jusqu'à leur libération au printemps. Dans les zones chaudes, la reproduction peut se produire en continu tout au long de l'année (Benson & Raikow 2008). Les femelles sont généralement sexuellement matures à partir de leur deuxième année. Les œufs sont expulsés par les femelles et fécondés à l'extérieur du corps par les mâles. La dreissène se reproduit de juin à octobre en fonction de la température de l'eau (dès que l'eau atteint 12 à 15 °C) (Borcherding 1991). Jusqu'à un million d'œufs peuvent être produits au cours d'une saison de ponte. Les œufs fécondés éclosent en trochophores (40-60 µm, 1 à 2 jours), qui se développent en un jour pour devenir une larve véligère planctonique nageant librement (Benson & Raikow 2008) ; ce stade est relativement long (environ 4 semaines). Les larves se dispersent passivement vers l'aval d'une rivière en suivant le courant ce qui favorise une large propagation (Benson & Raikow 2008), et atteignent le stade juvénile une fois qu'elles mesurent environ 350 µm. Elles s'installent au fond où elles rampent à l'aide d'un pied, à la recherche d'un substrat approprié (Kerambrun et coll. 2018). La dernière phase de leur développement est benthique lorsque le bivalve est fixé par un byssus comme chez les Mytilidés. La dreissène peut toutefois se détacher et possède ainsi une certaine mobilité. Une fois attachée, la durée de vie la dreissène est variable, mais peut aller de 4 à 9 ans (Benson & Raikow 2008). La reproduction et le développement larvaire de *D.r. bugensis* et *D. polymorpha* sont très proches. Il faut toutefois souligner que *D.r. bugensis* est très prolifique, une femelle mature pouvant produire des ovocytes en continu pendant plusieurs mois. Cet élément pourrait, en partie, expliquer la rapidité de l'expansion de cette espèce et son succès invasif (Wawrzyniak-Wydrowska et coll. 2019).

Il existe une plasticité phénotypique élevée chez les Dreissenidae qui peut être le résultat de facteurs environnementaux. En raison de cette variabilité de morphologie, l'identification visuelle n'est pas toujours suffisante pour différencier les moules quagga et zébrées, c'est pourquoi différentes méthodes de comparaison génétique ont été développées (Kerambrun et coll. 2016 ; 2018). La plasticité de la morphologie de la coquille des moules quagga est remarquable et pourrait leur faciliter la colonisation des habitats en eaux peu profondes comme profondes (Peyer, Hermanson, et Lee 2010). Ainsi *D. r. bugensis* se caractérise par une morphologie de coquille différente selon un développement dans des eaux profondes ou superficielles (Peyer, Hermanson, et Lee 2010) (figure 12). La forme profonde peut former des colonies et s'attacher à des objets avec ses fils byssaux ou bien

s'enfouir partiellement dans les sédiments mous et étendre son très long siphon au-dessus d'elle pour amener des particules de nourriture en suspension lui donnant un possible avantage de survie (Vanderploeg et coll. 2002).

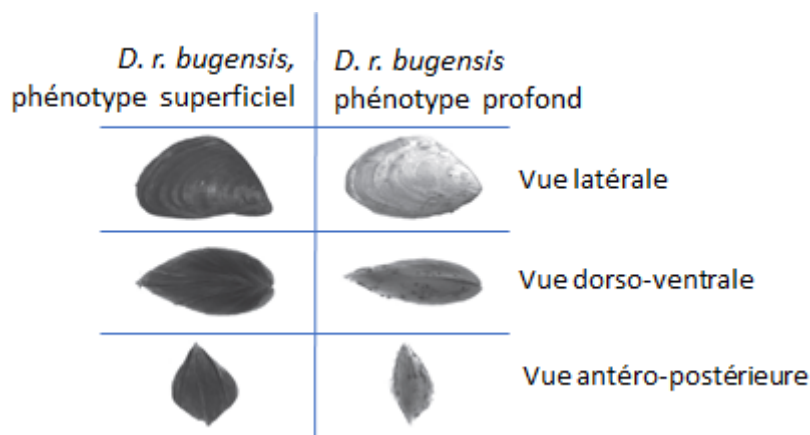


Figure 12 : Les différences morphologiques des moules quagga des eaux superficielles et des eaux profondes. Adapté d'après Peyer, Hermanson, et Lee (2010).

II.2.2.2. Les dreissènes en écotoxicologie

Depuis plus de vingt ans, *D. polymorpha* est utilisée comme espèce modèle en écotoxicologie, au même titre que la moule bleue (Binelli et coll. 2015 ; Pain-Devin et coll. 2014). Comme elle, la moule zébrée est une espèce filtreuse capable de tolérer une large gamme de contaminants environnementaux. Elle est présente dans presque tous les grands hydrosystèmes d'Europe et d'Amérique du Nord. (Binelli et coll. 2015 ; 2001 ; Kerambrun et coll. 2016 ; Le Guernic, Geffard, Rioult, et coll. 2020 ; Pain-Devin et coll. 2014) la considère comme une espèce sentinelle dulcicole équivalente de *Mytilus edulis*. Des 1997, (Salazar et Salazar 1997) soulignent sa capacité de bioaccumulation et sa forte résistance aux contaminants et appuient son utilisation comme espèce biomonitrice. De nombreuses études d'immunotoxicité ont été menées sur les hémocytes de *D. polymorpha* (Barjhoux et coll. 2020 ; Evariste et coll. 2016 ; Kerambrun et coll. 2016 ; Le Guernic, Geffard, Le Foll, et coll. 2020 ; Le Guernic, Geffard, Rioult, et coll. 2020 ; Leprêtre et coll. 2020). Très utilisée en toxicologie environnemental, sa nature invasive implique toutefois des comportements éthiques particuliers. Ainsi, dans le contexte de la WFD (European Union Water Framework Directive), des moules zébrées ont été encagées pour évaluer des concentrations de polluants (PCB, DDT, HAP, Cd, Cu Pb Cr....)(Besse, Geffard, et Coquery 2012) conduisant par la suite à une colonisation des zones d'encagement. Les études comparant les deux espèces de moule quagga et zébrée sont de plus en plus nombreuses et la question est posée de l'utilisation de *Dreissena. r. bugensis* en tant que sentinelle au même titre que *Dreissena polymorpha* (Boegehold, Johnson, et Kashian 2019; Kerambrun et coll. 2018; Louis et coll.

2019). Le tableau 1 dresse une comparaison de caractéristiques physiques et physiologiques des moules zébrées et quagga et montre de nombreux points semblables entre les deux espèces.

Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques des moules zébrées et quagga

Caractéristiques	Dreissena	
	<i>polymorpha</i>	<i>r. bugensis</i>
Mode de vie	Eau douce	Eau douce
Taille adulte	8-25mm	8-35mm
Reproduction	12-25°C	5-7°C
Ponte	Mars-Juin	Mars-Juin
Vie adulte (conditions optimales)	1 an	1 an
Durée de vie	3-9 ans	3-9 ans
Gamétogenèse	3-5 mois	3 mois
Métamorphose	5-35 jours	5-35 jours
Véligère	0,1 mm	0,1 mm
Séparation des deux valves	Droite	Sinusoïdale
Byssus	Loin de la charnière	Proche de la charnière
Coquille	Concave	Une dépression
Face ventrale	Plate	Convexe
Coquille	Solide	Fragile
Marquage	Rayures	Variable

Il est remarquable que les moules quagga et zébrées aient atteint un niveau élevé d'endémisme dans les lacs des Etats-Unis et en Europe de l'Ouest. Elles s'y sont maintenues grâce à une adaptabilité importante qui leur permet de coloniser des cours d'eau considérés comme des environnements "hostiles" avec une faible biodiversité et peuvent, dans ces zones, remplacer les espèces endémiques (Orlova et coll. 2005).

L'invasion des moules dulcicoles dans ces niches a des effets conséquents sur l'écosystème, parfois positifs du fait de leur activité de filtration élevée, souvent négatifs. Ainsi, les modifications du réseau trophique causées par les moules sont de grande ampleur et peuvent, dans certaines zones, provoquer la disparition du zooplancton et du phytoplancton ce qui impacte les niveaux trophiques suivants, comme ceux des crustacés et des poissons. De plus, la respiration de ces animaux peut modifier le niveau d'oxygène dissous. Enfin, ces invasions peuvent avoir un impact économique car les moules peuvent envahir les coques de bateaux, boucher les canalisations d'assainissement d'eau ou les systèmes de refroidissement d'usines ou de stations électriques.

IV. Approche protéomique

A l'origine, le terme "protéome" a été proposé pour remplacer l'expression « the total protein complement of a genome », c'est-à-dire le complément protéique total d'un génome (Wasinger et coll. 1995). Ainsi, le protéome correspond à l'ensemble des protéines présentes dans un organisme, un tissu ou une cellule à un moment donné et dans des conditions physiologiques ou environnementales données (Carbonara, Andonovski, et Coorssen 2021). Le protéome est un ensemble dynamique qui peut être considéré comme le reflet de l'état de santé d'un organisme. En effet, les protéines jouent un rôle central dans les systèmes d'adaptation et de défense de l'organisme mais sont aussi des cibles potentielles directes ou indirectes de médicaments ou de polluants et autres composés toxiques. C'est également un ensemble complexe : un gène et ses variants alléliques peuvent générer, *via* les épissages alternatifs et de nombreuses modifications post-traductionnelles, un grand nombre de protéoformes. Le terme "protéoforme" décrit toutes les formes moléculaires différentes d'un produit protéique d'un seul gène, y compris les changements dus aux variations génétiques, aux épissages alternatifs et aux modifications post-traductionnelles (Dang et coll. 2014).

Le but de l'étude protéomique est de décrire de façon quantitative et fonctionnelle l'expression protéique et ses modifications sous l'influence de perturbations biologiques, comme une maladie, un traitement médicamenteux ou encore une exposition à un stress environnemental. Les méthodes de protéomique permettent de comparer l'abondance des protéines et, pour certaines, de détecter des modifications post-traductionnelles (Diz, Martínez-Fernández, et Rolán-Alvarez 2012; G. W. Park et coll. 2016; Ponstingl et Thornton 2003).

La protéomique est un outil puissant ayant le potentiel de révéler des associations nouvelles et inattendues entre les protéines et l'exposition aux toxiques, sans hypothèses *a priori*. Cette approche permet de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'action toxique des polluants.

IV.1. Les stratégies d'analyse protéomique

Les analyses protéomiques reposent sur une stratégie commune : extraire - décomplexifier - identifier. Marcus et Rabilloud (2020) décrivent l'analyse de protéines comme régie par « la règle des 3 S » : les protéines sont difficiles à extraire pour en faire une analyse quantitative (**S**ticky), difficiles à fragmenter (**S**oft) et difficiles à séparer (**S**eparation-unfriendly). En effet, la gamme dynamique de l'expression des protéines (classiquement, de 1 à 10^6), ainsi que le nombre élevé de modifications chimiques et la quantité variable de matériel disponible, représentent quelques-uns des nombreux

aspects contribuant à la difficulté de la protéomique (Kearney et Thibault 2003). De plus, il existe des protéines acides quand d'autres sont basiques, des hydrophiles et des hydrophobes, ces dernières sont présentes en particulier dans les membranes biologiques et de ce fait, délicates à extraire.

IV.1.1. Extraction

L'extraction de protéines d'un échantillon a 3 grands objectifs : briser les interactions macromoléculaires afin de produire des chaînes polypeptidiques séparées, prévenir (ou contrôler) toute modification des polypeptides dans le milieu de solubilisation et permettre l'élimination des substances pouvant interférer avec l'analyse qui suivra.

Il n'existe pas de protocole unique pour l'extraction des protéines, il est toujours nécessaire d'adapter la procédure à l'espèce, la nature du tissu et la quantité de tissu disponible. Généralement, des inhibiteurs de protéases sont employés pour préserver les protéines. L'extraction se fait en provoquant la lyse de la cellule, mécaniquement (broyage, sonication, etc.) ou chimiquement (lyse enzymatique, choc osmotique, etc.), ce qui entraîne la libération des protéines mais aussi celle d'interférents (sels, lipides, etc.). Les échantillons peuvent être séparés des débris cellulaires par centrifugation et les fractions enrichies par précipitation (à l'acétone ou à l'acide tri-chloro-acétique par exemple).

IV.1.2. Décomplexification

Devant la gamme dynamique de concentrations et le nombre très élevé de protéines, l'analyse protéomique demande des procédures de décomplexification qui peuvent passer par des centrifugations, du fractionnement subcellulaire, des étapes d'électrophorèses et/ou des chromatographies. L'électrophorèse bidimensionnelle (2DE) consiste en deux étapes de séparation des protéines : la première en fonction de leur point isoélectrique (pI), la deuxième en fonction de leur poids moléculaire (PM). La 2DE permet de séparer et quantifier les protéines majoritaires et discrimine environ 1000 à 2000 protéoformes.

IV.1.3. Identification par spectrométrie de masse

L'identification d'une protéine se fait le plus généralement par spectrométrie de masse à partir des peptides issus d'une digestion enzymatique ciblée, classiquement avec la trypsine. Deux stratégies différentes sont déployées en fonction de l'étape où la digestion tryptique est réalisée, au préalable de l'analyse par spectrométrie de masse. Avec le développement d'appareils de spectrométrie de masse plus sensibles et plus précis, parallèlement à l'enrichissement des bases de données, les cartes protéomiques de certains organismes peuvent maintenant être obtenues de manière routinière et

approfondie en utilisant des méthodes shotgun. Dans ces méthodes, la digestion trypsique est réalisée avant les étapes séparatives. Dans l'analyse 2DE, l'étape séparative a lieu avant la digestion trypsique et seules les protéoformes d'intérêt sont analysées par spectrométrie de masse.

L'interprétation des résultats de spectrométrie de masse se fait avec des bibliothèques de données locales ou partagées et des logiciels dédiés parmi lesquels MaxQuant (moteur de recherche Andromeda), Proteome Discoverer et Peaks (moteur de recherche Sequest), MS-GF+ (moteurs de recherche Mascot) et X!Tandem. Afin d'évaluer la qualité de l'attribution d'une séquence à un spectre, ces algorithmes calculent un score pour chaque identification, qui reflète la probabilité p que l'assignation soit due au hasard. La stratégie d'identification par empreinte de fragments peptidiques consiste à comparer les données expérimentales à des données théoriques qui se trouvent dans les banques de données. Les protéines contenues dans ces banques sont digérées *in silico* selon les règles de digestion de l'enzyme utilisée et les peptides sont ensuite fragmentés *in silico* selon le mode de fragmentation utilisé. Les masses des peptides et fragments expérimentaux sont alors comparés aux masses des peptides et fragments théoriques grâce à un algorithme de recherche. Plus un peptide est identifié avec un grand nombre de fragments, plus l'identification est robuste.

IV.2. Etat de l'art protéomique *Mytilus* et *Dreissena*

A l'origine, la protéomique appliquée à la toxicologie environnementale s'est concentrée sur l'évaluation des changements dynamiques du protéome chez des organismes exposés à des stress chimiques simples ou complexes. De nos jours, les problématiques associées au changement climatique sont également prises en compte. L'application de la protéomique en surveillance environnementale avec des bivalves a fait l'objet d'une revue par A. Campos et coll. (2012). Les auteurs ont examiné de nombreux biomarqueurs utilisés pour décrire et comprendre les effets des polluants. Dans cette revue est décrit comment, en appliquant des approches protéomiques, nous pouvons obtenir des informations détaillées sur les modifications biochimiques à partir de tissus d'organismes sentinelle exposés à la pollution, que ce soit en laboratoire ou lors de prélèvements *in situ*. De plus, la revue présente l'utilisation des signatures d'expression protéique (PES) ou "fingerprinting" comme un outil potentiel pour caractériser les expositions chimiques et prédire leur mode d'action. L'utilisation des PES n'a cependant pas été développée. Par ailleurs, Campos a souligné que la recherche protéomique chez les bivalves ne s'appuyait pas encore suffisamment sur les techniques de pointe de MS qu'il considère comme précieuses pour obtenir des réponses plus complexes et développer de futures stratégies de biosurveillance. Le principal obstacle à l'utilisation de la MS est la faiblesse des connaissances des génomes et des transcriptomes de bivalves. Enfin, Campos a insisté sur l'importance

des technologies OMICS pour développer de nouveaux biomarqueurs reflétant à la fois l'exposition aux produits chimiques et les conséquences biologiques de cette exposition.

Depuis cette revue, de nouveaux travaux mettant en évidence des protéoformes modifiées par des expositions à un stress ont été réalisés chez *Mytilus* sp et *D. polymorpha*. Le tableau 2 en propose une synthèse. Ont été volontairement exclus, les expérimentations sur la biominéralisation et les études centrées sur les stades larvaires. Les travaux publiés sur ce sujet au sein du laboratoire constituent un matériel de travail et de ce fait, ces travaux seront détaillés dans la partie matériel du manuscrit.

Tableau 2 : Synthèse des études protéomiques sur les genres *Dreissena* et *Mytilus*

Dreissena sp.					
Tissu	Condition	Technique	Résultats	Exemples de DAP	Publication
Br	Polystyrène (microplastiques) 2 particules/μL	shotgun	78 DAP	Surexpression de la glutathion réductase, Cytosquelette modulé (11 protéines différentes), isocitrate déshydrogénase, enolase, phosphoglycérate kinase, fructose-bisphosphate aldolase et GAPDH. Protéasome (su. régulées à la hausse et à la baisse)	Magni 2019 10.1016/j.envpol.2019.04.088
Br, it	Pollution microplastique	shotgun	44 DAP	Cytosquelette, protéines ATP dépendantes, protéines de liaison à l'ADN, chaperonnes, métabolisme énergétique	Magni, S., 2021 10.1016/j.jhazmat.2021.125204
Br, GD	Pollution terrain	2DE	42 DAP	identités non cherchées	Pain-Devin 2014 10.1016/j.aquatox.2014.06.008
Br	Benzoylcegonine (0.5 - 1 μg.L ⁻¹), 14 j	2DE	24 DAP	HSP70, Tubuline, glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, oxydation du cytosquelette	Pedriali et al., 2013 ; 10.1002/dta.1409
Br	PCB (200 ng.L ⁻¹) 7 j	2DE	15 DAP	Modification d'une HSP, de 2 isoformes d'actine, de tubuline beta, glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, enolase et phosphoglycérate kinase	Riva 2014 10.1016/j.cbd.2013.08.005
Br	B[a]P (0.1-2.0 μg.L ⁻¹) 7 j	2DE	14 DAP	DUPD1, N-acétyltransférase 8-like protéine, Aspartate aminotransférase, Actine, Alcool déshydrogénase class-3, Peroxiredoxin-6	Riva et al., 2011 10.1016/j.aquatox.2011.03.008
Br	Triclosan, 580 ng.L ⁻¹ 7 jours	2DE	12 DAP	HSP70, Tubuline, GAPDH, Myosine, Cytosolique malate deshydrogénase, Sarcoplasmique calcium-binding protéine, Annexine B9, 14-3-3	Riva et al., 2012 10.1016/j.aquatox.2012.03.013

... / ...

Mytilus sp.					
Tissu	Condition	Technique	Résultats	Exemples de DAP	Publication
it	PCB 30µg.L ⁻¹ 3 semaines	2DE	21 DAP, la majorité sous exprimée	Enolase surexprimée, actine sous exprimée, malate déshydrogénase sous exprimée, protéine 14-3-3 sous exprimée, GST surexprimée	Ambrosio 2018 10.4315/0362-028X.JFP-17-148
Br	terrain	2DE	13 DAP	GST, HSC 71 et actine	Azevedo 2015 doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.08.008
Br	1000µg/l Propranolol pour 4 semaines + stress hyposmotique	shotgun	44 DAP	ATP synthase beta sous-unité, rétinol déshydrogénase, citrate synthase, transaldolase et UDP-glucose 4-epimerase augmentés, 14-3-3 protéine diminuée, GST diminuée et actine modifiée	Campos et al. 2016 doi: 10.1016/j.jprot.2016.01.010
GD	Nanoparticules d'argent 21,3µg Ag/g d.w 21 jours	2DE	104 DAP	GAPDH, MDH1, SOD, actine sous-exprimés	Duroudier 2019 /10.1016/j.aquatox.2019.02.010
HL	Lésion muscle adducteur	2DE	7 DAP	CuZn superoxide dismutase surexprimé, sHSP22, myosine, tropomyosine	Franco-Martínez 2018 /10.1016/j.fsi.2018.01.038

Mytilus sp.					
Tissu	Condition	Technique	Résultats	Exemples de DAP	Publication
Br GD	Nanoparticules de cuivre 10 µg/g	2DE	45 DAP (Br) 108 DAP (GD)	Actine sous-exprimée, caspase diminuée, cytochrome oxydase III modifié, tubuline alpha surexprimé, ATP synthase F0 surexprimé	Gomes 2014 10.1016/j.aquatox.2014.07.015
HL	25µg.L ⁻¹ (0.5 - 330 µm) plastique conventionnel (polyéthylène de haute densité) ou biodégradable (acide polylactique) 2h/jour pendant 52 jours	shotgun	40 DAP	Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase, aminopeptidase, rétinol déshydrogénase 1, aspartate cytoplasmique protéine et phosphoglycérate kinase surexprimés et réduction d'inhibiteur de métalloprotéinase	Green 2019 10.1016/j.envpol.2018.12.017
Br	terrain	2DE	37 DAP	actine, tubuline, sous-unités d'ATPsynthase, isocitrate dehydrogenase et enolase	Helmholz 2015 doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.07.021
Br	<i>V.parahemolyticus</i> , <i>V.tubiashi</i> , <i>V.splendidus</i> , <i>V.alginoyticus</i> , 1h	LC-MS	env. 10 DAP	CuZn SOD diminué, myticine C augmenté, HSP 70, HSP 90 et HSC 71	Hernroth 2016 https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.007
Br GD Ma	particules de CuO 400, 700 ou 1000 ppb pour 1h	2DE	6 DAP	alpha- beta-tubulin, actin, tropomyosin, triosephosphate isomerase et Cu-Zn superoxide dismutase	Hu 2014 https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.054

... / ...

Mytilus sp.					
Tissu	Condition	Technique	Résultats	Exemples de DAP	Publication
Br	10µg/L BDE 47 1 mois	2DE	12 DAP	14-3-3 protéine, tubuline alpha, GST et Proteasome subunit alpha	Ji 2013 doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.07.009
Br	107 CFU/mL de vibrio 24h	2DE	15 DAP	nucleoside diphosphate kinase, astacin, procollagen-proline dioxygenase beta subunit and electron transfer flavoprotein subunit alpha, Glutathione S-transferase sigma 3ependymin-like protein precursor	Ji 2013 http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.009
Br	18,4 nmol/L TBBPA	ITRAQ	31 DAP	GAPDH et arginine kinase augmentés, actine et tubuline diminués, HSC71, GRP78 diminués	Ji 2016 https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.052
Br	BaP ou Cu à 10 µg /L ou mélange	2DE	95 DAP	sous-unité ATP synthase F0, actine sous exprimée CAT, GST et GPx augmentés, MVP	Maria 2013 doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.009
HL	Terrain	2DE	8 DAP	CuZn superoxide dismutase, actin, astacine	Oliveira 2014 doi.org/10.1016/j.cbd.2014.07.003
it	HAP ou PCB, 6 j	2DE	env. 100 DAP	Hsp60, hsp70 and hsp90 sur exprimés	Olsson B et al., 2004 10.1007/978-94-017-0920-0_2

Mytilus sp.					
Tissu	Condition	Technique	Résultats	Exemples de DAP	Publication
Spz	Terrain	2DE	45 DAP	Isocitrate dehydrogenase [NAD], arginine kinase, Electron transfer flavoprotein, 20S Proteasome sous-unités alpha et beta	Romero 2019 /10.1016/j.jprot.2018.08.020
Br	Ignifugeant chloré (TDCPP) 10 µg.L ⁻¹ , 28 j	LC-MS	306 DAP	protéine associée aux cils et flagelles surexprimée, AChE, Ribosomal S6 kinase sous-exprimées	Sanchez marin 2021 10.1016/j.aquatox.2020.105688
it	100µM Sirumine et 25mM nicotinamide, 6h	2DE	59 DAP	Actine et tubuline diminués, sHSP 24, SOD, NADH ubiquinone oxidoreductase, 14-3-3 proteine, GAPDH et MDH1 augmentés	Vasquez 2020 doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110719
Hp	50 µL à 107 CFU/ mL de vibrio	2DE	25 DAP	ATPase type V, proteasome 20 S beta 7, malate dehydrogenase 1, arginine kinase, sHSP24.1	Wu 2013 doi.org/10.1016/j.jprot.2013.09.001
it	As 50 µg/L 84h	2DE	7 DAP	14-3-3 protéine, actine, Mn-SOD sous-exprimées	Yu et al. 2016 10.1016/j.chemosphere.2016.01.113
it	40 µL de d12-TCEP à 1000 pg.µL ⁻¹	ITRAQ	219 DAP	Groupes fonctionnels : Synthèse des protéines, métabolisme énergétique, cytosquelette, immunité et reproduction	Zhong 2020 10.1016/j.envpol.2020.115537

Légende : Br, branchies, GD, glande digestive, Ma, manteau, HL, hémolymph, HP, hépatopancréas, Spz, spermatozoïdes, *it*, *in toto*. Les approches de protéomique : Shotgun, spectrométrie de masse sur échantillons trypsinisés avant séparation par chromatographie liquide haute performance ; LC-MS, spectrométrie de masse sur échantillons trypsinisés avant séparation par chromatographie liquide ; iTRAQ, spectrométrie de masse sur échantillons trypsinisés avant marquage isobarique et séparation par chromatographie liquide. Les DAP sont les protéoformes dont l'abondance varie entre deux conditions.

- ***Mytilus sp.***

Chez *Mytilus*, des expositions très diverses ont été réalisées : nanoparticules d'argent, microplastiques, chlorobiphényles (PCBs), ou stimulation immunologique via des bactéries (Duroudier, Cardoso, et coll. 2019 ; Green et coll. 2019 ; Ambrosio et coll. 2018 ; Ji, Wu, Wei, Zhao, Wang, et coll. 2013). Les travaux ciblent souvent un seul tissu : hémolymph (Green et coll. 2019 ; Franco-Martínez et coll. 2018; Nguyen et Alfaro 2020), branchies (Oliveira et coll. 2016 ; Azevedo et coll. 2015 ; Sánchez-Marín et coll. 2021 ; Hernroth et coll. 2016 ; Ji, Wu, Wei, Zhao, Wang, et coll. 2013 ; Ji et coll. 2016; Ji, Wu, Wei, Zhao, et Yu 2013) et glande digestive (Hu et coll. 2014 ; Viarengo et coll. 2007). Seules 4 publications s'appuient sur l'étude de l'ensemble des tissus mous (Zhong et coll. 2020 ; Ambrosio et coll. 2018 ; Yu et coll. 2016 ; Olsson et coll. 2004).

Quatorze articles traitent de stress simples (Zhong et coll. 2020 ; Green et coll. 2019 ; Ambrosio et coll. 2018 ; Oliveira et coll. 2016 ; Yu et coll. 2016 ; Azevedo et coll. 2015 ; Helmholz et coll. 2015 ; Hu et coll. 2014 ; Ji, Wu, Wei, Zhao, et Yu 2013 ; H. Wu et coll. 2013 ; Ji, Wu, Wei, Zhao, Wang, et coll. 2013). A l'inverse, sept articles étudient les effets de stress multiples comme une hypo-osmolarité associée à une exposition au propranolol (Campos et coll. 2016), une combinaison de métaux lourds et de benzoapyrène (Maria et coll. 2013). Quatre études sont consacrées à des moules prélevées sur le terrain pour des approches plus écophysiologiques (Romero et coll. 2019 ; Oliveira et coll. 2016b ; Azevedo et coll. 2015; Helmholz et coll. 2015).

Trois articles notent la présence de protéines modifiées tant en poids moléculaire qu'en point isoélectrique. Ainsi, Duroudier et coll. (2019) mettent en évidence une GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) partielle, Hu et coll. (2014) révèlent des éléments du cytosquelette tronqués, et Ji, Wu, Wei, Zhao, et Yu (2013) détectent une forme partielle d'une protéine de liaison au manganèse.

Les publications étudiant le protéome branchial (8 au total) des moules marines mettent en évidence des protéoformes fréquemment rencontrées. Le profil d'expression protéique spécifique observé montre généralement que l'exposition à un stress modifie les protéines liées au métabolisme du pyruvate, au cycle des tricarboxyliques, au métabolisme de la cystéine et de la méthionine et au métabolisme du glyoxylate et du dicarboxylate. De plus une modification du métabolisme énergétique est observé dans de nombreuses études se traduisant par une diminution d'expression de protéines comme la malate déshydrogénase, l'aldolase et l'énolase (Cardoso, et coll. 2019 ; Green et coll. 2019 ; Ambrosio et coll. 2018 ; A. Campos et coll. 2016 ; Duroudier ; Helmholz et coll. 2015). Des modifications du cytosquelette sont très courantes. Par exemple, Yu et coll. 2016 ; Vasquez, Martinez, et Tomanek (2020), Hu et coll. (2014) et Ji, Wu, Wei, Zhao, Wang, et coll. (2013) ont mis en évidence une

modification des filaments d'actine lors de stress oxydant suite à des expositions à des contaminations chimiques (au BaP, PCB, médicaments ou aux métaux lourds). Enfin, 4 études signalent l'apparition de protéoformes tronquées ou modifiées de sorte que leur PM/Pi ne sont pas ceux attendus et sous-tendent la possibilité qu'elles soient marqueurs de stress par elles-mêmes (Duroudier, Cardoso, et coll. 2019 ; Azevedo et coll. 2015 ; Hu et coll. 2014a ; Ji, Wu, Wei, Zhao, et Yu 2013).

- ***Dreissena sp.***

Les études protéomiques consacrées à *Dreissena* sont récentes et demeurent peu nombreuses. Elles portent sur la tolérance à différents métaux (nickel, cadmium...) de populations majoritairement de *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* (Magni et coll. 2019; Pain-Devin et coll. 2014 ; Riva et Binelli 2014 ; Pedriali et coll. 2013 ; Riva, Cristoni, et Binelli 2012). Quatre études publiées par l'équipe Riva et coll, (Consuelo Riva et coll. 2011; Consuelo Riva, Cristoni, et Binelli 2012; Pedriali et coll. 2013b; C. Riva et Binelli 2014) recherchent les réponses protéiques de dreissènes à différents contaminants chimiques, PCB, BaP triclosan et Benzoylécgonine en utilisant une approche par 2DE. Magni et ses collaborateurs ont étudié les réponses de dreissènes à différentes concentrations de microplastiques par LC-MS (Magni et coll. 2019 ; Magni et coll. 2021). Les protéines mises en évidence sont des éléments du métabolisme énergétique comme l'isocitrate déshydrogénase, l'énolase, la phosphoglycérate kinase, la fructose-bisphosphate aldolase, des éléments du cytosquelette et 3 protéines du protéasome régulées à la hausse. Enfin, Pain-Devin et coll. (2014) a mis en évidence des PES dans une étude terrain de dreissènes sans faire d'identification MS.

Au final, que ce soit chez *Mytilus* ou *Dreissena*, trois grandes catégories de protéines reviennent systématiquement lors des études de protéomique appliquées à la biosurveillance des milieux marins à savoir des modifications d'abondance de protéines chaperonnes (Vasquez, Martinez, et Tomanek 2020 ; Azevedo et coll. 2015 ; Ji, Wu, Wei, Zhao, Wang, et coll. 2013 ; Olsson et coll. 2004), d'éléments du cytosquelette et des enzymes du métabolisme énergétique. Ces protéines sont aussi retrouvées dans le cas de stress multiples (Campos et coll. 2016 ; Azevedo et coll. 2015 ; Helmholz et coll. 2015). Ces données montrent que les ruptures d'homéostasie impliquent des processus communs, à la fois liés aux dommages qui peuvent en découler et aux mécanismes de résistance déployés (Vasquez, Martinez, et Tomanek 2020).

Les modèles animaux utilisés dans les études environnementales, comme les moules du genre *Mytilus* n'ont pas été le sujet d'une construction de génome communautaire publique. La démocratisation des techniques à haut débit appliquées aux moules (Campos et coll., 2012 ; Campos et coll., 2015) et le séquençage du génome de l'huître avec sa mise à disposition gratuite (Riviere et

coll., 2015) ont permis d'étoffer les bases de données sur les mollusques ces dernières années, offrant de nouvelles possibilités d'étude sur des organismes modèles exotiques (Spratt et Pardee 1975). Actuellement, 4 génomes assemblés sont disponibles sur NCBI avec 173 620 protéines sur 5 espèces de moules (dont 88 809 pour *M. galloprovincialis* et 83 924 pour *M. edulis*). Cette abondance de donnée semble grande, mais il est important de rappeler l'important nombre de doublons et de protéines de mauvaise qualité dans ces bases de données. Ainsi en 2020, López-Pedrouso et coll. (2020) soulignaient le manque de banques annotées et son impact négatif sur la caractérisation de la réponse au stress chez ces animaux. Par comparaison, il y a plus de 129 040 protéines présentes dans les bases de données pour *Crassostrea gigas*, représentant une seule espèce.

Le moonlighting des protéines (le fait qu'une protéine puisse avoir une fonction secondaire inattendue dans des conditions spécifiques) complique l'interprétation du nombre croissant de séquences génomiques, ainsi que l'annotation des bases de données de séquences et de structures de protéines. Les prédictions de la fonction d'un nouveau gène ou d'une nouvelle séquence protéique sont souvent calculées automatiquement sur la base d'une homologie de séquence d'acides aminés. Le fait que les protéines ont souvent une ou plusieurs autres fonctions que leur fonction canonique peut rendre difficile l'interprétation fonctionnelle de la séquence identifiée (Jeffery 2014).

V. Stress et réponses au stress

V.1. Le stress cellulaire

Le stress cellulaire peut conduire à la mort de la cellule par l'activation de différents processus dont l'apoptose dans le cas où les capacités de défenses sont dépassées et l'homéostasie perdue (Cannon 1929).

La croissance et la productivité ainsi que la reproduction et le développement des organismes aquatiques et terrestres sont fortement influencés par de multiples facteurs de stress externes. La façon dont ces organismes vont répondre aux variations de plusieurs de ces facteurs environnementaux parfois en même temps est mal comprise à l'heure actuelle. Alors que dans le passé, les effets des facteurs individuels ont souvent été analysés dans des conditions de laboratoire contrôlées, il devient de plus en plus évident que les effets additifs, synergiques ou antagonistes de tous ces facteurs dans l'environnement doivent être pris en compte. Par exemple, dans certains cas, l'exposition à un stress peut conférer une tolérance ou une sensibilité à un autre facteur.

Les stress cellulaires sont multiples car tout élément provoquant la rupture d'homéostasie peut être considéré comme un stress conduisant le plus souvent à une production d'espèces oxydantes (figure 13).

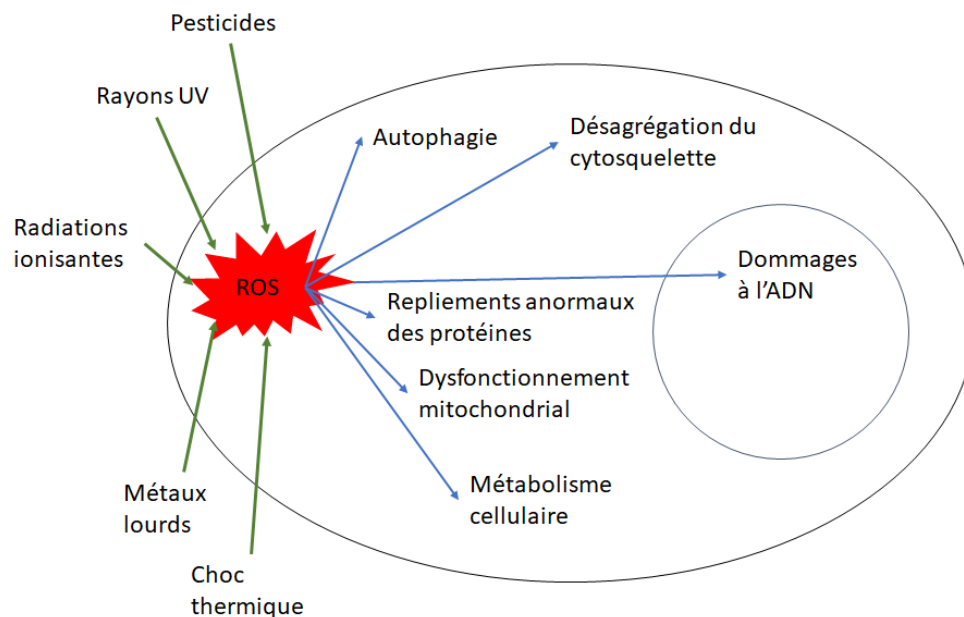


Figure 13 : Dommages associés à une surproduction de ROS sous l'effet de stress (d'après Dimova, Bryant et Chankova, 2008).

V.2. La réponse cellulaire au stress

Il est remarquable que quel que soit le stress, des mécanismes communs sont mis en œuvre traduisant une réponse générale stéréotypée aux stress (CSR : « cellular stress response »). Ainsi, le stress cellulaire déclenche un large éventail de réponses, de l'activation de voies qui favorisent la survie cellulaire à l'initiation de la mort cellulaire régulée. En règle générale, les réponses au stress cellulaire permettent d'abord aux cellules de s'adapter et de survivre. Si l'agression ne peut pas être résolue, des voies de signalisation de la mort cellulaire sont initiées. La capacité de la cellule à développer une réponse appropriée est essentielle pour déterminer le destin cellulaire (Wu et coll. 2020). La CSR vise à réparer les dommages et à augmenter temporairement la tolérance cellulaire face à ces dommages. Cette réponse se fait en trois étapes : détection des signaux de stress, transmission des signaux et activation des fonctions de défenses (Kültz 2005).

Les fonctions métaboliques clés de la CSR sont la maintenance de l'intégrité des macromolécules, le contrôle du cycle cellulaire, la régulation de la balance rédox, l'adaptation du métabolisme énergétique et l'apoptose. Si la CRS a largement été démontrée dans les études concernant des modèles classiques, il apparaît que cette réponse est aussi conservée chez les mollusques.

Ainsi, les chaperonnes Heat Shock Protein, HSP, participent à la réponse CSR également chez les mollusques. Leur activation est reconnue comme marqueur de stress cellulaire général. Ces protéines sont classées par taille (HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 et smallHSP) et interviennent dans les différents compartiments de la cellule (figure 14).

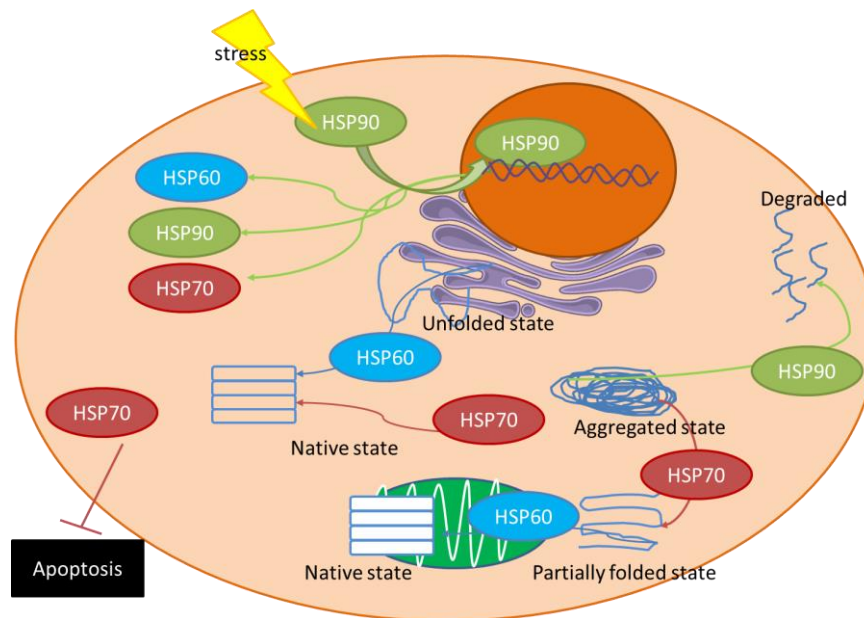


Figure 14 : Rôles des principales HSP (d'après Gestwicki et Shao 2019). Les Heat Shock Proteins, HSP, interviennent dans les différents compartiments de la cellule où elles remplissent normalement un nombre important de fonctions. Dans un contexte de stress, les chaperonnes HSP70, HSP90 et HSP60 forment un complexe autour de la protéine dénaturée afin de permettre sa restauration. D'autres HSP évitent la formation d'agrégats de protéines dénaturées. Quand une protéine est trop abîmée, les HSP70 peuvent provoquer sa polyubiquitinylation et de là, son adressage au protéasome.

Le réticulum endoplasmique (RE) joue un rôle dans le traitement post-traductionnel des protéines, notamment le repliement, la maturation, le contrôle de la qualité et le trafic vers d'autres compartiments cellulaires. En cas de stress, les cellules activent une série de mécanismes pour faire face à l'accumulation des protéines présentant des défauts de repliements. Ces mécanismes sont connus sous le nom de « unfolded protein response » (UPR). L'UPR participe à la régulation de divers processus, allant du métabolisme des lipides et du cholestérol, à l'homéostasie énergétique, l'inflammation et la différenciation cellulaire (Hetz 2012). Les protéines intervenant dans ces voies sont nombreuses avec, par exemple, les protéines chaperonnes dont GRP78 (aussi connue sous le nom de BiP et HSP5A), PERK, ATF6 et IRE1.

L'UPR peut être classé en deux parties distinctes, appelées UPR adaptatif et UPR apoptotique (Gorman et coll. 2012). Les réponses adaptatives diminuent la quantité de protéines synthétisées, en

augmentant les niveaux de chaperonnes pour aider à replier les protéines non repliées, ou en dirigeant les protéines mal repliées vers le protéasome pour qu'elles soient dégradées et ainsi alléger la charge de protéines accumulées dans le RE. Toutefois, si le stress est trop important, l'UPR se déclenche en faveur de l'apoptose. Le protéasome vient en complément de la réponse UPR en dégradant les protéines qui lui sont adressées.

En cas de stress, la traduction globale s'arrête et les ARNm liés à la machinerie de traduction et à d'autres protéines se regroupent pour former des granules de stress. Youn et coll. (2019) avancent l'hypothèse que les granules de stress sont des conglomérats de molécules cytosoliques qui se forment par la séparation de phases des ARN et des protéines. Ils participent au contrôle de la traduction et servent de tampon au protéome.

En cas de stress oxydant, les acteurs antioxydants restaurent l'homéostasie cellulaire. Ces acteurs peuvent être des enzymes antioxydantes telles des peroxydases, des glutathion-S-transférases ou réductases, les catalases, les superoxyde dismutases. Il peut s'agir également d'antioxydants non enzymatiques comme le glutathion ou les polyphénols.

Le métabolisme énergétique est également impliqué dans la CSR. L'énergie assimilée par un organisme est incorporée dans un pool commun à partir duquel elle est utilisée pour l'entretien, l'activité, la croissance, le développement et la reproduction. Une certaine quantité d'énergie assimilée est incorporée dans la réserve énergétique sous forme de lipides, de glucides et/ou de protéines, ce qui permet de stocker l'énergie excédentaire. Les réserves énergétiques jouent un rôle important dans la fourniture rapide de demandes énergétiques élevées pendant l'exposition au stress (Inna M. Sokolova et coll. 2012). Ces demandes énergétiques ont un impact sur les cycles classiques à savoir le cycle de Krebs, la glycolyse et la néoglucogenèse, la voie des pentoses phosphates et les phosphorylations oxydatives de la chaîne respiratoire mitochondriale. La mesure des acteurs du métabolisme énergétique est souvent utilisée dans les études de la réponse cellulaire au stress.

Objectifs

Les organismes aquatiques font face à des stress complexes liés aux fluctuations abiotiques classiques du milieu et aux conséquences de l'anthropisation en termes de contamination mais aussi de changements climatiques. Cette pression sur les écosystèmes impose le développement de nouveaux outils de biosurveillance permettant de suivre la qualité des milieux. La recherche de ces outils, indicateurs ou biomarqueurs nécessite en amont l'identification des mécanismes et des acteurs moléculaires impliqués qui peuvent être caractéristiques d'un stress donné ou au contraire plus généralistes et participer à la réponse stéréotypée au stress.

Ainsi, l'objectif principal de cette thèse est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu dans la réponse générale au stress en identifiant les acteurs protéiques impliqués chez des bivalves marins et dulcicoles des genres *Mytilus* et *Dreissena*.

La stratégie retenue consiste à explorer les récurrences dans les réponses moléculaires de ces bivalves à différents stress afin de mettre en évidence les acteurs protéiques communs. L'originalité de ce travail est d'exploiter une bibliothèque de données protéomiques déjà acquises au sein du laboratoire. En effet, depuis 2008, des analyses comparées de protéomes branchiaux ont été réalisées par électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse afin d'étudier les réponses de dreissènes et de moules bleues exposées en conditions contrôlées à des stress chimiques simples ou complexes et/ou physiques. Cette bibliothèque comprend des images de gels, des tableurs issus des comparaisons protéomiques et des spectres de masse. Il s'agit ici de réaliser une analyse transversale et intégrée de ces données générées de façon indépendante pour mettre en évidence les protéoformes dont l'abondance est régulièrement modifiée par les conditions d'exposition.

Dans un premier temps, cette recherche a reposé sur une nouvelle analyse des spectres de masse afin d'améliorer, affiner et/ou confirmer les identifications protéiques déjà obtenues, grâce à l'intégration de données transcriptomiques et à l'enrichissement des bases de données nucléotidiques et protéiques classiques. Les acteurs communs ont ensuite été recherchés par compilation des données des tableurs de comparaison protéomique et un criblage bibliographique, en lien avec la réponse générale aux stress, a été réalisé. Une attention particulière a été portée aux protéoformes et aux protéines multifonctionnelles. Cette analyse a permis de sélectionner des acteurs protéiques qui ont été soumis à des analyses bio-informatiques et bibliographiques plus fines afin de mieux les caractériser chez nos espèces modèles.

Matériel et Méthodes

I. Matériel

Le matériel utilisé dans ce travail de thèse consiste en des données acquises en écotoxicologie par l'équipe d'accueil sur la période 2008-2018 dans le cadre de programmes régionaux, nationaux et internationaux. Une partie de ces données a déjà fait l'objet de plusieurs publications (Letendre et coll., 2011 ; Péden et coll., 2014, Péden et coll., 2016 ; Péden et coll., 2018 ; Bultelle et coll., 2021). Ces données incluent des ensembles d'analyses protéomiques avec les images de gels, les tableurs d'analyse statistiques, les fichiers de spectrométrie de masse avec l'identification protéique associée résultant de l'analyse initiale. Les paragraphes suivants ont pour objet la description des expérimentations protéomiques en précisant les différentes conditions de stress testées.

I.1. Description des expérimentations

I.1.1. Expérimentations sur les moules bleues

I.1.1.1. Expositions à un stress chimique

Les données sont issues de travaux réalisés dans le cadre du programme de Recherche DECIME INSU/ECODYN (2004-2007) « Dynamique et effets biologiques des contaminants organiques dans le contexte d'intertidalité d'un organisme sentinelle, *Mytilus edulis* ». Des spécimens de moules bleues adultes, *M. edulis*, d'une longueur de coquille de 4 à 5 cm, ont été collectés à partir d'un site intertidal naturel localisé sur la commune d'Yport, située dans le nord de la France (49 ° 44'N, 0 ° 18'E). Les moules ont été placées dans un système de stabulation artificiel avec contrôle de la température et de la photopériode. Avant l'exposition, les moules ont été acclimatées à leur nouvel environnement pendant une semaine puis exposés sur une durée de 7 ou 14 jours. Les concentrations ont été choisies en fonction de la contamination de l'environnement et sont du même ordre de grandeur que les valeurs maximales obtenues pour la baie de Seine. Pendant toute l'expérience, les moules ont été nourries 2 fois par jour avec un mélange de *Skeletonema costatum* et *Tetraselmis suecica*. Une mortalité homogène, inférieure à 5%, a été observée en fin de l'expérience. Pour chaque prélèvement, un groupe témoin a été réalisé. Lors des prélèvements, les branchies ont été disséquées et plongées dans de l'azote liquide puis conservées à -80°C.

Condition HAP7 : 7 jours d'exposition à un mélange d'hydrocarbures aromatiques (phénanthrène 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ and benzo[a]pyrène 500 ng. L^{-1}) ;

Condition HAP14 : 14 jours d'exposition à un mélange d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (phénanthrène 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ et benzo[a]pyrène 500 ng. L^{-1}) ;

Condition CB153 : 14 jours d'exposition à un polychlorobiphényle type, le CB153 (2,2',4,4',5,5'–hexachlorobiphényle 500 ng. L^{-1}).

I.1.1.2. Expositions à un stress thermique

I.1.1.2.1. Moules issues de la baie de Seine

Les données sont issues de travaux réalisés dans le cadre des programmes de Recherche Normands GRR TERA/ SCALE, FESEL 2008-14 et GRR TERA/ SCALE, DECA 2015-20. Les animaux utilisés pour les expositions à un stress thermique sont également des moules bleues adultes, *M. edulis* d'une classe de taille de 3,5 à 4 cm. Les sites de collecte sont Yport, faiblement contaminé et Le Havre (lieu-dit Le bout du monde), au contraire fortement pollué. Les moules ont été placées dans un système de stabulation artificiel reproduisant un microcosme intertidal. Pour chaque site, un groupe témoin a été constitué avec des moules disséquées dès la collecte. Après une période de stabulation, les moules ramenées au laboratoire sont placées dans des enceintes séparées à une température de l'eau de 18°C, température qui sera maintenue tout le long de l'expérimentation. La première phase de l'exposition consiste à placer pendant 7 jours les animaux dans des conditions de températures aériennes différentes : oscillant entre 16,5°C et 21,5°C mimant ainsi les conditions estivales actuelles d'une part, et d'autre part, entre 18°C et 26°C (scénario prévisionnel du GIEC d'élévation des températures à l'horizon 2100). Après ce conditionnement différentiel, les deux groupes sont exposés à un stress caniculaire identique pendant 3 jours. Sur ces 3 jours, la température aérienne va osciller entre 20°C et 35°C. À la fin des expositions, les individus sont disséqués et les branchies sont plongées immédiatement dans l'azote liquide puis conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Condition CAN3LH : 3 jours d'exposition à un stress caniculaire (moules bleues provenant du Havre)

Condition CAN3YP : 3 jours d'exposition à un stress caniculaire (moules bleues provenant de Yport).

I.1.1.2.2. Moules issues de l'archipel des Kerguelen

Les données sont issues de travaux réalisés dans le cadre de l'ANR IPOC (2013-2016) « Interactions entre la POLLution et les Changements climatiques : développement d'une nouvelle stratégie de

surveillance ». Des spécimens adultes de moules bleues, *M. edulis platensis* d'une classe de taille comprise entre 5,5 et 7 cm de longueur, ont été collectés sur la côte rocheuse de Port-aux-Français (îles Kerguelen, France). Les moules ont été immédiatement transférées au laboratoire de Port-aux-Français et placées dans un aquarium aéré à température contrôlée (7,5°C, température terrain) contenant de l'eau de mer filtrée en recirculation maintenue sur un cycle lumière / obscurité de 12 h : 12 h. Après une semaine de stabulation, un groupe d'animaux a été maintenu dans ces conditions (groupe témoin), la température de l'eau de l'autre groupe (groupe soumis à un stress thermique modéré) a progressivement été augmentée par palier journalier de 1,5°C jusqu'à 20 °C. Les branchies des animaux ont été prélevées après trois semaines d'expérimentation puis congelées dans l'azote liquide et expédiées jusqu'au laboratoire d'analyse (transport en surgélateur).

Condition STM21K : 21 jours d'exposition à un stress thermique modéré (moules bleues des Kerguelen)

I.1.2. Expérimentations sur les dreissènes

- **Exposition à un stress chimique :**

Les données sont issues de travaux réalisés dans le cadre du programme de Recherche PolQua de la Fondation ROVALTAIN (2016-2017) « Moule zébrée ou moule quagga, identification génétique et comparaison des réponses biologiques aux stress : quelle implication en écotoxicologie ? ». Les dreissènes ont été collectées en février 2017, dans le chenal de la Meuse pour les moules zébrées (Euville, France, N48 ° 44'03 ", E05 ° 39'45 ") et dans la Saône pour les moules quagga (Seurre, France, N47 ° 00 ' 03 ", E05 ° 08'34 "). Les moules ont été amenées au laboratoire et mises en stabulation dans l'eau ramenée du terrain, espèces séparées. Durant les trois premiers jours, l'eau a été progressivement remplacée par de l'eau de source (Cristaline®, source Aurèle). Ensuite, l'acclimatation s'est poursuivie pendant 21 jours avec un renouvellement de l'eau deux fois par semaine et un nourrissage avec une culture fraîche de *Chlorella* et *Senedesmus* (Greensea).

Suite à la stabulation, une exposition au cadmium à la concentration 100 µg/L a été réalisée pendant 7 jours. Les moules ont alors été disséquées et les branchies congelées dans de l'azote liquide et conservés à -80°C pour analyse ultérieure. Pendant l'exposition, l'eau a été renouvelée quotidiennement et les moules ont été nourries comme précédemment. En parallèle, un groupe contrôle a été réalisé pour chaque espèce. Aucune mortalité n'a été observée.

Condition Cd7Pol : 7 jours d'exposition (moules zébrées, *D. polymorpha*) au cadmium (100 µg. L⁻¹)

Condition Cd7Bug : 7 jours d'exposition (moules quagga, *D. r. bugensis*) au cadmium (100 µg. L⁻¹)

I.2. Description des analyses 2DE

Les paragraphes suivants donnent les détails des différentes opérations mises en œuvre dans l'approche protéomique utilisant la 2DE, de la préparation des échantillons à la séparation par IEF puis par SDS-PAGE, avant la coloration et l'analyse d'image permettant une excision des protéoformes d'intérêt en vue de leur analyse par spectrométrie de masse (figure 15).

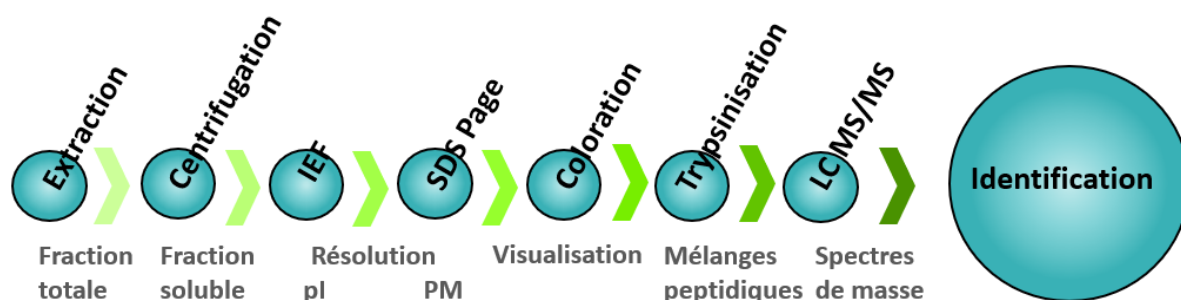


Figure 15 : Stratégie d'analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle. Les protéines solubles sont obtenues après broyage dans un tampon d'extraction et centrifugation. Le mélange est séparé par isoélectrofocalisation (IEF) et électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). La séparation est visualisée par coloration au bleu colloïdal. Après analyse d'image, les protéoformes d'intérêt sont excisées des gels et digérées par trypsinisation. Les peptides résultants sont analysés par spectrométrie de masse après séparation par chromatographie liquide (LC MS/MS).

I.2.1. Préparation des échantillons

Les tissus branchiaux ont été broyés dans un tampon Urée 9 M, CHAPS 2%, DTT 65 mM et pharmalytes 0,02% (GE Healthcare). Les échantillons ont ensuite été soumis à une sonication de 30 secondes puis centrifugés à 10 000 *g* pendant 20 minutes. Les surnageants ont été récupérés et les protéines dosées en utilisant la méthode de Bradford (Bradford 1976).

I.2.2. IEF : première dimension

Lors de l'isoélectrofocalisation, les protéines sont séparées en fonction de leur pI sur un gradient de pH immobilisé sur des bandelettes de gel. Dans la phase séparative, la protéine chargée se déplace jusqu'au point isoélectrique (pI), point de pH où elle se focalise. De nombreux gradients de pH sont disponibles en fonction du type de protéines et de l'exploration souhaitée, allant de gradients de pH 3 à 11 à des gels qui peuvent présenter une seule unité pH. En utilisant un gradient de pH 3-10 non linéaire, l'IEF augmente la résolution sur une gamme de pH comprise entre pH 5 et pH 8, ce qui correspond à des valeurs de points isoélectriques pour de très nombreuses protéines.

Les échantillons ont été déposés sur les gels pendant une phase de réhydratation passive (urée 8 M, CHAPS 2 %, dithiothreitol 10 mM, IPG Buffer pH 3-10 NL 1 %, GE Healthcare). L'IEF a été réalisée sur gels de 18 cm en gradient de pH immobilisé 3-10 non linéaire (Immobiline DryStrip 3-10NL, GE

Healthcare) en respectant les conditions électriques indiquées par le fabricant (MultiTemp III, Amersham-Pharmacia).

I.2.3. SDS PAGE : deuxième dimension

Avant de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire par une électrophorèse sur gel d'acrylamide, celles-ci doivent préalablement être chargées négativement par incubation avec une solution contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS). Deux autres traitements, une réduction au dithiothréitol (DTT) et une alkylation à l'iodoacétamide ont aussi été réalisés. Les bandelettes ont été ainsi placées dans un tampon de rééquilibration (Tris 0,5 M pH 6,8, urée 6 M, SDS 1% et glycérol 26%) contenant du DTT 30 mM pendant 15 minutes puis dans du tampon de rééquilibration contenant de l'iodoacétamide 245 mM pendant 5 minutes.

L'électrophorèse a été réalisée sur grands gels dans des conditions permettant une bonne séparation des protéines de 15 à 150 kDa (12% acrylamide dans tampon Tris/Glycine 1,5 M pH 8,8, 20 cm x 20 cm x 1,5 mm). Deux dodecacell ont été utilisées afin d'autoriser la migration en parallèle de 24 gels (Dodecacell, BioRad). Les paramètres de migration sont les suivants : 15 minutes à 0,6 A puis 15 minutes à 1 A et enfin 7 heures à 250 V ; la température est maintenue par refroidissement par bain circulant.

I.2.4. Coloration au bleu colloïdal

Les protéines présentes dans les gels sont révélées en utilisant une coloration au bleu colloïdal. Bien que de sensibilité inférieure à celle d'autres colorations (nitrate d'argent, sondes fluorescentes) cette coloration possède un certain nombre d'avantages : linéarité, simplicité, reproductibilité et compatibilité avec la spectrométrie de masse. De plus, la coloration est visible à l'œil nu ce qui facilite les spottages manuels.

Les protéines sont tout d'abord fixées avec une solution d'éthanol 50%, acide phosphorique 1,4% sur une nuit (16 h). Après 3 lavages de 30 minutes à l'eau distillée, les gels sont mis à incuber dans une solution de sulfate d'ammonium 17%, acide phosphorique 1,4% et méthanol 34% pendant 1 heure. À la fin de cette incubation, une solution de bleu de Coomassie G-250 (5% p/v dans du méthanol) est ajoutée pour une concentration finale de 1,4% p/v. La coloration est maximale après une semaine d'incubation.

I.2.5. Analyse d'images et traitement statistique

Les gels sont scannés par transparence (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad) et exportés en .tiff 16-bits dans les logiciels d'analyse protéomique. Deux logiciels différents ont été utilisés : Melanie

(Bio-Rad, Geneva, Switzerland, SIB Swiss Institute of Bioinformatics, GeneBio) et Delta2D (DECODON, GmbH, BioTechnikum Greifswald, Germany).

Le logiciel delta 2D applique l'alignement de l'image avant la détection ce qui permet de créer une compilation des images appelée « image de fusion ». La trame ainsi formée est transposée sur chacun des gels, ce qui permet d'extraire le profil d'expression des protéoformes. Le logiciel Melanie en revanche utilise une calibration des images permettant de définir les coordonnées horizontales et verticales des spots sur chaque image. Ce logiciel analyse les gels un par un avant de relier les spots communs entre gels d'une même condition expérimentale. Malgré l'automatisation de l'analyse d'images, une intervention manuelle est nécessaire afin d'éviter les problèmes suivants : chevauchement en un seul spot de plusieurs spots qui demandent une segmentation, non détection de certains spots, présence d'artéfacts confondus avec des spots et approximation incorrecte de la limite des spots. Dans les deux logiciels, le volume des spots (en % du volume total) est calculé ce qui permet d'établir les comparaisons. Après un test-t de Student ou une Anova, les spots considérés comme significativement différents ont été sélectionnés pour excision et identification par spectrométrie de masse.

La procédure de 2DE est rappelée dans la figure suivante (figure 16).

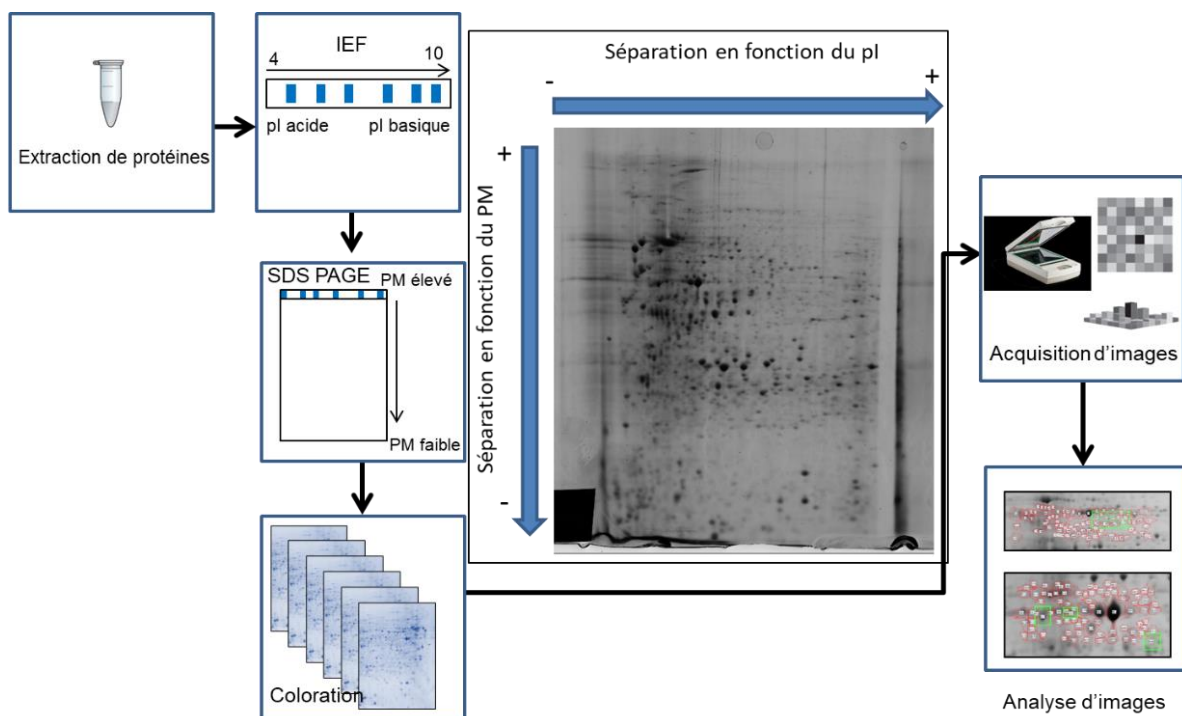


Figure 16 : Les principales étapes du protocole d'électrophorèse bidimensionnelle.

I.3. Spectrométrie de masse

I.3.1. Techniques de spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse a joué un rôle essentiel dans l'identification des protéines. En phase gazeuse, les liaisons amide du squelette peptidique sont typiquement les sites préférentiels de protonation. Ces liaisons amide protonées sont affaiblies et, lors de l'activation par collision, sont clivées de façon préférentielle afin de créer une série d'ions produits homologues. Lors de l'activation par collision d'un ion précurseur de peptide sélectionné, l'énergie est déposée sur une échelle de temps relativement lente (picosecondes). Le clivage enzymatique d'un peptide ou d'une protéine en petits peptides, suivi de l'analyse LC-MS/MS d'un ou plusieurs de ces peptides protéolytiques donnent des peptides de signature utilisés pour l'identification protéique. Cette identification a des limites dans la mesure où elle ne repose que sur certains peptides d'une protéine, plutôt que sur la protéine entière. Ainsi, il peut manquer des informations critiques, telles que les PTM, les variants de séquences et les isoformes, ainsi que les produits de troncature et de dégradation (Zhang et Jian 2014). Ainsi, chaque produit de clivage du squelette n'est pas systématiquement observé du fait de la formation de peptides préférentiels au détriment d'autres peptides. Cependant, les peptides uniques sont considérés comme des éléments indispensables pour caractériser et quantifier les protéines d'intérêt correspondantes.

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec la plateforme de Protéomique PISSARO, IRIB, Rouen. Les spectromètres de masse utilisés ne sont pas les mêmes sur l'ensemble des séries avec un ESI-Trap pour les séries HAP7, HAP14 et CB153 et un ESI-QUAD-TOF pour les autres séries. Le protocole de préparation des échantillons pour l'analyse par spectrométrie de masse est resté identique avec une digestion des protéines par la trypsine. Après une séparation par chromatographie (HPLC, nano-LC) les peptides ont été injectés dans une source ionisante électrospray (technique ESI). Les peptides ionisés sont éjectés et leurs masses sont ensuite mesurées selon le temps de vol (time of flight, TOF). Les peptides présents dans le mélange peuvent être isolés puis fragmentés dans une chambre de collision. La masse de chaque fragment produit est alors mesurée (MS/MS).

- **ESI-Trap**

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'une chromatographie nanoLC-1200 couplée à un spectromètre de masse comportant un système 6340 ion trap avec interface HPLC-chip cube (Agilent Technologies). Les peptides ont été séparés sur une puce HPLC Agilent (colonne d'enrichissement de 40 nL; canal de séparation LC de 43 mm de long × 75 µm de diamètre intérieur) qui est emballée avec une matrice en phase inversée C18 (taille de pore zorbax 300-Å, particule de 5 µm taille) en appliquant

un gradient binaire de 17 min (solvant A: 0,1% acide formique; solvant B: 0,1% acide formique, 90% acétonitrile) allant de 3% à 80% de solvant B à un débit de 300 nL / min. Les peptides séparés ont été soumis à une ionisation par électrospray et analysés. Des scans MS complets de 300 à 2200 m/z ont été enregistrés, et les cinq pics les plus intenses ont été soumis à l'analyse MS/Ms en tenant compte d'une exclusion dynamique après 2 spectres. Les ions chargés (+1) ont été exclus de la sélection.

- **ESI-QUAD-TOF**

Les spots des études plus récentes (post-2013) ont été analysés avec un système nano-LC1200 couplé à un Q-TOF 6520 spectromètre de masse équipé d'une source nanospray et d'une interface HPLC-chip cube (Agilent Technologies). Un gradient linéaire de 30 min (3-80% d'acétonitrile dans 0,1% d'acide formique), à un débit de 370 nL/min, a été utilisé pour séparer les peptides sur une colonne polaris-HR-Chip C18 (150 mm de long 75 µm de diamètre). Des balayages autoMS1 complets de 200 à 1700 m/z et autoMS2 de 59 à 1700 m/z ont été enregistrés. Dans chaque cycle, un maximum de 5 précurseurs triés par état de charge (2+ préférentiel avec exclusion des ions à charge unique) a été isolé et fragmenté dans la cellule de collision. L'énergie de la cellule de collision a été automatiquement ajustée en fonction du rapport m/z. L'exclusion active de ces précurseurs a été activée après 2 spectres en 1 min, et le seuil de sélection des précurseurs a été fixé à 4000 coups. Une liste de pics pour la recherche dans la base de données a été créée à l'aide de l'analyse qualitative de MassHunter Workstation (version B.04.00; Agilent Technologies)(Domon et Aebersold 2006).

I.3.2. Fichiers de masse

A la fin de l'analyse par spectrométrie de masse, un fichier de données de masse brut (.dta) très lourd est généré et sert à la création d'un fichier secondaire plus exploitable. En fonction du système d'analyse, différents formats de fichiers sont utilisés. Les fichiers de masse des premières expérimentations sont des fichiers .mgf puis, à partir de 2014, des fichiers avec l'extension .mzdata ou .XML. Lorsque les données brutes de format .dta ont pu être récupérées, elles ont été converties en .mzXML grâce au logiciel ProteoWizard msConvert (Kessner et coll. 2008). Il est important de noter que la précision des données de masse s'est améliorée en changeant de spectromètre de masse, ce qui a généré des fichiers plus informatifs, mais aussi plus lourds. Ainsi de 2008 à 2012, les données acquises sont des fichiers de 300 ko à 600 ko ; ensuite la taille des fichiers va de 40 000 à 187 000 ko.

.dta : Le format DTA est un format du logiciel SEQUEST. Ce format est structuré simplement. La première ligne contient la masse peptidique protonée et l'état de charge du peptide sous la forme d'une paire de valeurs séparées par des espaces. Les lignes suivantes contiennent des paires séparées par des espaces d'ions de fragments m/z et des valeurs d'intensité.

.mgf (mascot generic format) : ce fichier est généré pour être lu par Mascot. Dans ce format, chaque ensemble de données MS/MS est une liste de paires de valeurs de masse et d'intensité, délimitées par des instructions BEGIN IONS et END IONS.

.XML : Le format XML est plus détaillé. Il est utilisé à la fois en format de fichier d'entrée et de sortie dans l'analyse des données de masse. Le fichier est séparé en plusieurs sous-groupes logiques tels que : paramètres (contenant les paramètres de la recherche et les statistiques de performances associées à l'ensemble de la recherche), histogrammes (calculés pendant l'identification et qui servent à décrire les résultats) ou encore modèle (contiennent toutes les informations sur une seule identification peptidique, y compris le spectre de masse d'origine, des histogrammes sur les statistiques d'une identification, les séquences peptidiques qui correspondent au spectre et les séquences protéiques contenant ces peptides). Certains des paramètres stockés dans les fichiers peuvent être déterminés directement par le logiciel d'affichage des données.

.mzXML : ce format est intermédiaire, permettant à plusieurs formats d'entrée d'être soumis à un pipeline d'analyse de données commun. De nouveaux types d'instruments peuvent être intégrés dans un cadre d'analyse préexistant avec seulement un utilitaire pour convertir la sortie native MS au format mzXML. Les fichiers mzXML sont interopérables et open source ce qui les rend appropriés pour l'échange de données. Par exemple, il est possible de les joindre à une publication.

.mzdata : Ce format est construit de la même manière que les fichiers mzXML.

1.3.3. Banques de données pour l'analyse des spectres de masse

Il s'agit des banques de données disponibles en ligne (NCBI, Swissprot, EMBL...) et de banques propriétaires correspondant aux quatre espèces, *Mytilus galloprovincialis* (tous tissus), *Crassostrea gigas* (tous tissus), *Dreissena polymorpha* (branchies) et *Dreissena rostriformis bugensis* (branchies). Ces dernières ont été obtenues dans un cadre collaboratif (Arnaud Tanguy, Station Biologique de Roscoff, Laboratoire Adaptation et Diversité en Milieu Marin ; Simon Devin, LIEC, Université de Lorraine et Romain Péden (Péden et coll. 2019).

I.4. Récapitulatif des données disponibles

Tableau 3 : Synthèse des éléments matériels disponibles.

Code	Conditions	Espèce	Nombre de spots	Spots variants	Augmentation	Diminution	Nombre de spectres
STM21K	Stress thermique modéré (21 jours)	<i>Mytilus edulis</i>	957	49	37	12	288
CAN3YP	Stress Caniculaire - Yport (3 jours)	<i>Mytilus edulis</i>	807	111	78	33	127
CAN3LH	Stress Caniculaire - Le Havre (3 jours)	<i>Mytilus edulis</i>	1025	168	87	81	276
HAP7	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (7 jours)	<i>Mytilus edulis</i>	963	131	77	54	74
HAP14	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (14 jours)	<i>Mytilus edulis</i>	900	119	57	62	138
CB153	Polychlorobiphényle 153 (14 jours)	<i>Mytilus edulis</i>	636	118	34	84	192
Cd7Bug	Cadmium (7 jours)	<i>Dreissena rostriformis bugensis</i>	1419	134	71	63	288
Cd7Pol	Cadmium (7 jours)	<i>Dreissena polymorpha</i>	1560	88	60	28	384

Légende : la première colonne reprend le code utilisé dans la suite du document pour chaque expérimentation. Rappel des conditions, exposition à un stress thermique respectivement, modéré de 21 jours (**STM21K**), caniculaire de 3 jours (**CAN3LH** et **CAN3YP**) sur des moules en provenance des Kerguelen, K, du Havre, LH, d'Yport, YP) ; exposition de moules bleues à un mélange d'hydrocarbures aromatiques respectivement de 7 jours (**HAP7**) et de 14 jours (**HAP14**) ; exposition de 14 jours à un polychlorobiphényle (CB153) ; exposition 7 jours au cadmium de moules zébrées (**Cd7Pol**) et de moules quagga (**Cd7Bug**).

II. Méthodes

II.1. Procédure d'identification des spectres de masse

L'identification des protéines se fait par criblage des peptides issus de l'analyse MS/MS avec des banques de données en ligne (NCBI, Swissprot, EMBL...) ou locales (.fasta) via des logiciels dédiés (MASCOT-Matrix Science et X!TANDEM).

Sur les premières séries, celles de 2008 à 2012, les fichiers de masse ont été analysés en utilisant Mascot (version 2.0, Matrix Science). Sur les séries suivantes, l'analyse a été faite en utilisant le pipeline X!Tandem.

Les algorithmes de recherche les plus utilisés pour interpréter les spectres de masse en tandem sont Mascot (Matrix Science) et SEQUEST. Historiquement, les spectres MS/MS acquis par ion trap ont été analysés avec SEQUEST, alors que Mascot a été utilisé pour identifier les spectres TOF. Sur la base d'au moins une étude, il semblerait que, pour les spectres MS / MS acquis par piège à ions, les deux algorithmes soient assez comparables (Elias et coll. 2005).

II.1.1. Mascot

Lors d'une recherche Mascot, les sous-ensembles de pics les plus intenses sont sélectionnés et notés de manière itérative, à la recherche du meilleur score, ce qui permet d'isoler les pics du signal du bruit de fond. Le logiciel Mascot Daemon version 2.2.2 (Matrix Science) a été utilisé avec les paramètres suivants :

- clivage enzymatique par la trypsine avec la possibilité d'un clivage manqué
- modifications sur les acides aminés : oxydation des méthionines, carbamidométhylation des cystéines
- peptides chargés 2+ and 3+
- tolérance de masse des ions précurseurs : 20 ppm
- tolérance de masse des ions après fragmentation : 0,06 Da
- base de données, NCBI avec en restriction de taxonomie : autres métazoaires
- seuil de significativité $p < 0,05$.

Dans le rapport de résultats généré, un score est attribué à chaque identification protéique retrouvée sur la base du nombre et de la qualité des peptides identifiés. Les spectres non attribués de la liste sont fournis en fin de rapport et triés par intensité de précurseur. De la sorte, il est possible de

connaître les spectres les plus intenses qui n'ont pas réussi à obtenir une correspondance significative. Le logiciel Mascot fournit également directement des informations sur les protéines : PM, pl, PTM.

Un exemple de résultat est proposé dans la figure 17.

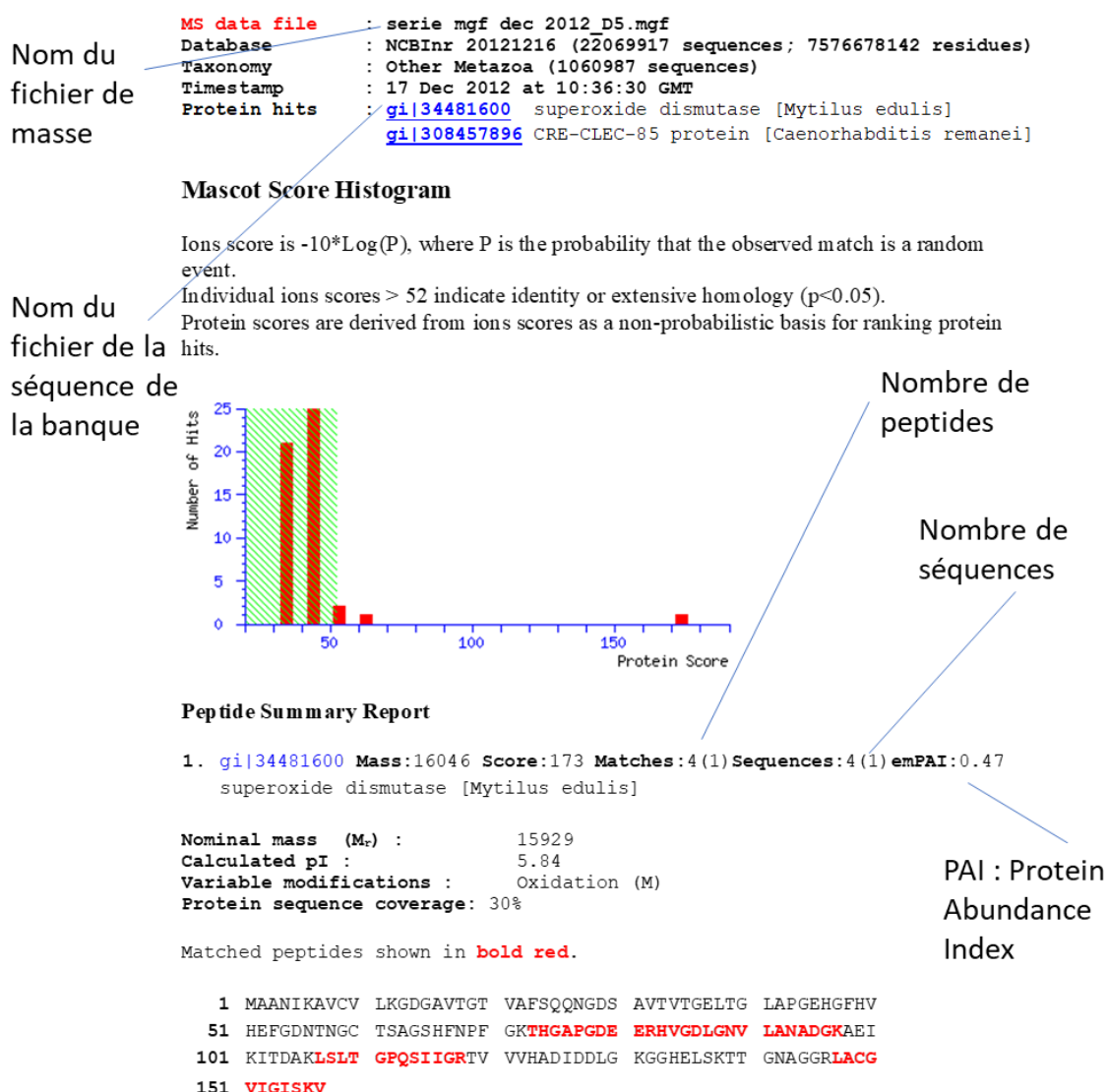


Figure 17 : Rapport d'identification type généré par Mascot (version 2.0, Matrix Science).

II.1.2. X!Tandem

Ce moteur de recherche open source est disponible sous la GNU (General Public License) via PAPPISO (une plateforme d'analyse protéomique de l'INRAE Jouy en Josas, avec accès direct par le lien suivant : <http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/>).

X!Tandem peut gérer l'interrogation et le post-traitement de plusieurs échantillons à la fois. Ce logiciel peut également rechercher plusieurs bases de données simultanément et concaténer les résultats d'identification (Langella et coll. 2017). X!Tandem utilise des filtres à la recherche des peptides spécifiques. Il rassemble toutes les affectations de peptides dans un ensemble de données et détermine statistiquement le fait que l'assemblage et les alignements ne sont pas aléatoires.

X!Tandem élimine les protéines identifiées par un sous-ensemble de peptides sur la base de spectres et non de séquences. Une protéine n'apparaîtra pas dans les résultats si elle n'est identifiée que par un spectre et que ce spectre peut être attribué à une autre protéine. En revanche, si des peptides uniques apparaissent, des résultats seront générés et les protéines seront classées en différents sous-groupes ou groupes. Dans la pratique, X!Tandem s'utilise en chargeant une ou plusieurs banques de séquences (au format FASTA) et en spécifiant les fichiers de masse à analyser avec les paramètres de recherche suivants :

- clivage enzymatique par la trypsine avec la possibilité d'un clivage manqué
- modifications sur les acides aminés : oxydation des méthionines, carbamidométhylation des cystéines
- tolérance de masse des ions précurseurs : 20 ppm
- tolérance de masse des ions après fragmentation : 0,5 Da
- maximum peptide Evaluated 0,05
- seuil de significativité $p < 0,01$.

X!Tandem effectue les tâches dans cet ordre :

1. Lire les fichiers de paramètres d'entrée XML ;
2. Lire des séquences de protéines à partir de fichiers FASTA ;
3. Lire les spectres MS/MS dans les formats ASCII courants (DTA, PKL-PEAKS et Matrix Science) ;
4. Conditionner les spectres MS / MS pour éliminer le bruit et les artefacts courants ;
5. Traiter des séquences peptidiques avec des réactifs de clivage, des modifications post-traductionnelles ;
6. Marquer les séquences peptidiques ;
7. Créer un fichier de sortie XML capturant les meilleures séquences d'identification et certaines distributions statistiquement pertinentes.

Il affiche les résultats selon deux principes :

1. Les protéines identifiées avec le même pool de peptides sont assemblées en sous-groupes ;
2. Les protéines sont regroupées par fonction (identifiées avec au moins un peptide commun), affichant les peptides spécifiques pour chaque sous-groupe de protéines.

Les résultats de X!Tandem peuvent être exportés dans des fichiers texte tabulés (.txt) ou sous forme de feuille de calcul (.ods). La séquence des protéines identifiées peut être exportée au format FASTA, la séquence complète de la protéine sélectionnée est affichée, avec les peptides identifiés mis en évidence, et la couverture protéique, la e-value et la masse théorique sont spécifiées. Les e-values

des peptides et des protéines calculées sur la base de données réelles et sur une base de données « decoy » (leurre) peuvent également être obtenues pour calculer et choisir des seuils FDR (false discovery rate).

Un exemple de résultat est proposé dans la figure 18.

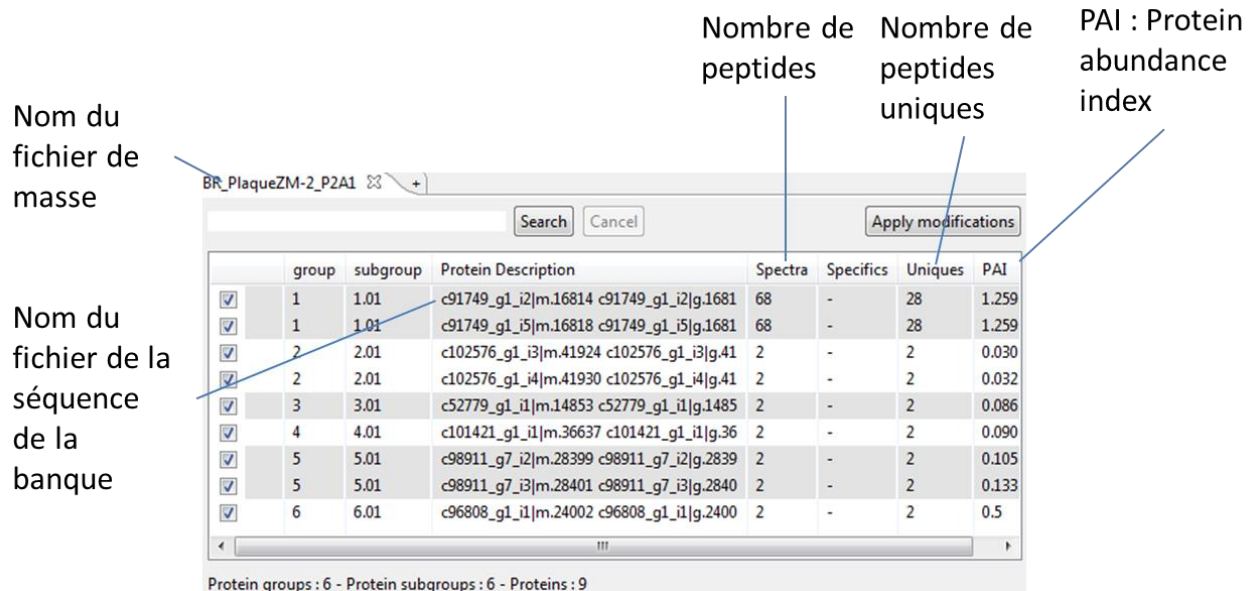


Figure 18 : Rapport d'identification type généré par X!Tandem, PAPPISO.

Dans cet exemple la séquence reconnue est la suivante (en jaune les zones de recouvrement) :

> contig de correspondance:

MICSLFFFCVITSLATIPRPRGVSI~~SMAS~~WYKPGA~~EFR~~CIDGSKSLPF~~EY~~INDDYCD~~CPDGS~~DEPGT
SACPGGKFHCTNAGFKPLN~~ILSSR~~VGDGICDCCDGTDEWEGNIECVNNCKELGKKM~~REEAELVRQLQE~~
QGHTLKLQYMETGKKTRAVKKTELEELQKTKVELET~~VKNEME~~QKNEAETPEKEAKEKHEQAWKEELE
KIKAAKDKVKAETA~~FYEMDEN~~KDNRVDLAEVKAHSQFDVDNNGEVCDTEAREHLELGDEDTHVDMAHF
IEKVVPNIREFYKSPSELQAAAKGEKQGEVPEAPKEEENKEKPSVADDEKMPDYDELTKQLMAVADVA
RNQFTEAEKKLKD~~TESQIRN~~LETYLGIDYGPNEEF~~SVLKGNC~~YEYTDREYTYKMC~~GFDKATQ~~RSKSGG
SETTLGNWGWKWDGPAHDKYAIMNYENGQSCWNGPNRSVKVHLKCGTDNKL~~TGASE~~PSRCEYAFDFETP
SRCSEPPTTHQLHTEL

Coverage: 56%

MW: 55.6 Da

Value: -107.53144

Avec une banque de transcrits annotés, l'identification de la protéine est directe. Dans le cas contraire, la séquence obtenue doit être comparée à des séquences déjà connues. C'est l'objet du blast qui sera décrit dans le paragraphe outils omiques.

II.2. Autres outils d'analyses omiques

De nombreux outils supplémentaires ont été utilisés pour améliorer la caractérisation des protéines identifiées. Ces outils peuvent être regroupés selon les informations qu'ils apportent : des informations sur la fonction, sur les structures primaires et secondaires de la protéine, les domaines conservés et autres homologies de séquences, sur le clivage protéolytique, sur les réseaux d'interaction des protéines. Des interfaces accessibles en ligne regroupent nombre de ses outils.

II.2.1. Outils génériques

- **NCBI**- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Le NCBI (National Center for Biotechnology Information), une division de la National Library of Medicine (NLM) du National Institute of Health américain propose en ligne des outils informatiques appliqués au domaine de la biologie. Le NCBI héberge environ 40 bases de données de littérature et de biologie moléculaire dont PubMed et GenBank. Il permet de déposer des informations génomiques, transcriptomiques ou protéomiques (par exemple la séquence d'une protéine), de télécharger ces données et d'utiliser de nombreux outils pour les analyser. Il constitue une ressource précieuse de séquences de protéines utiles à notre étude ainsi que d'informations sur les isoformes et les contextes de mise en évidence de ces protéines.

- **Uniprot** <https://www.uniprot.org/uniprot/>

Universal Protein Resource (UniProt) est issue d'une collaboration entre l'Institut européen de bioinformatique (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics et le Protein Information Resource (PIR). C'est une source complète d'informations pour les fonctions et séquences des protéines avec de nombreux liens vers d'autres banques de données.

- **Genecards** <https://www.genecards.org/>

GeneCards est une base de données qui fournit des informations sur tous les gènes humains annotés et prédits. La base de connaissances intègre automatiquement des données centrées sur les gènes provenant de 150 sources web, y compris des informations génomiques, transcriptomiques, protéomiques, génétiques, cliniques et fonctionnelles. Ces bases sont plus fournies que celles issues de données protéomiques d'espèces modèles exotiques et permettent une comparaison structurelle potentielle lorsque les séquences entre espèces sont proches.

II.2.2. Informations d'identité

- **Blast**

Les alignements et identifications de séquence ont été effectués à l'aide de l'algorithme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Le service BLAST basé sur le site en ligne du NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) permet d'effectuer des recherches par rapport à une sélection de bases de données de séquences (figure 19).

The screenshot shows the NCBI BLAST search interface. It includes the following sections:

- Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)**: A text area containing a FASTA sequence. A 'Clear' link is next to it.
- Query subrange**: Fields for 'From' and 'To'.
- Or, upload file**: A button 'Choisir un fichier' and a status 'Aucun fichier choisi'.
- Job Title**: A text input field with a placeholder 'Enter a descriptive title for your BLAST search'.
- ☐ **Align two or more sequences**.
- Choose Search Set**:
 - Database**: A dropdown menu set to 'Non-redundant protein sequences (nr)'.
 - Organism**: A text input field containing 'Mollusca (taxid:6447)', an 'exclude' checkbox, and an 'Add organism' button. A note below says 'Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown.'
 - Exclude**: Three checkboxes for 'Models (XM/XP)', 'Non-redundant RefSeq proteins (WP)', and 'Uncultured/environmental sample sequences'.
- Program Selection**:
 - Algorithm**: Radio buttons for 'Quick BLASTP (Accelerated protein-protein BLAST)', 'blastp (protein-protein BLAST)' (selected), 'PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)', 'PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST)', and 'DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST)'. A 'Choose a BLAST algorithm' link is at the bottom.

Figure 19 : Formulaire de recherche BLASTP pour une séquence (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

A côté de l'interrogation en Blast classique, le site Web propose une interface SMART BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/>) basée sur la base de données des espèces modèles mammifères ou arthropodes. Cette base comprend les protéomes dérivés de 27 génomes couvrant une large gamme taxonomique. Cet ensemble de recherche est produit en utilisant les meilleurs assemblages génomiques disponibles pour chaque organisme.

Les résultats BLAST apparaissent sous une forme tabulaire et graphique, avec une liste des protéines correspondant à des alignements avec la séquence soumise (figure 20).

BLAST® » blastp suite » results for RID-UVTU0ST6016 Home Recent Results Saved Strategies Help

[◀ Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary ▼](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

i Your search is limited to records that include: Mollusca (taxid:6447)

Job Title	Protein Sequence
RID	UVTU0ST6016 Search expires on 12-07 17:34 pm Download All ▼
Program	BLASTP Citation ▼
Database	nr See details ▼
Query ID	lcl Query_62639
Description	None
Molecule type	amino acid
Query Length	492
Other reports	Distance tree of results Multiple alignment MSA viewer ?

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments Download [New](#) Select columns ▼ Show [?](#)

Description ▼	Max Score ▼	Query Cover ▼	E value ▼	Per. Ident ▼	Accession
PRKCSH [Mytilus coruscus]	521	98%	0.0	50.57%	CAC5360633.1
protein kinase C substrate 80K-H [Mytilus galloprovincialis]	501	100%	2e-173	47.48%	VDH90525.1
PRKCSH [Mytilus edulis]	437	100%	5e-149	45.28%	CAG2224340.1
protein kinase C substrate 80K-H [Mytilus galloprovincialis]	307	63%	1e-100	46.85%	VDI81268.1
protein kinase C substrate 80K-H [Mytilus galloprovincialis]	306	63%	1e-100	48.88%	VDI81267.1
PRKCSH [Mytilus coruscus]	314	92%	4e-100	53.45%	CAC5360631.1
protein kinase C substrate 80K-H [Mytilus galloprovincialis]	293	63%	6e-95	45.11%	VDI81265.1
PRKCSH [Mytilus edulis]	231	40%	8e-73	56.50%	CAG2226663.1
protein kinase C substrate 80K-H [Mytilus galloprovincialis]	231	58%	2e-70	58.24%	VDI81266.1
PRKCSH [Mytilus edulis]	234	95%	6e-70	44.48%	CAG2224339.1

Figure 20 : Exemple de résultat obtenu par BLASTP : les résultats apparaissent sous forme d'une liste de protéines associées à des valeurs de score (Max Score), de taux de recouvrement (Query Cover), d'e-value (E Value), de pourcentage d'identité (Per. Ident) et à une référence GenBank (Accession).

II.2.3. Informations de structure

II.2.3.1. Structures primaires

- **Expasy** (<https://web.expasy.org>)

L'institut Suisse de bioinformatique (SIB) a développé une interface accessible en ligne Expasy (**Expert Protein Analysis System**) proposant de nombreux logiciels adaptés à l'analyse des protéines et également un serveur de recherche de logiciels pour les analyses omics (Gasteiger et coll. 2003 ; Artimo et coll. 2012). Plusieurs outils ont servi à l'obtention de résultats lors de cette thèse :

- **Compute pI/Mw** (https://web.expasy.org/compute_pi/) est un outil qui permet de calculer le pI (point isoélectrique) et le Mw (poids moléculaire) théoriques par rapport aux protéines de la base de connaissances UniProt (Swiss-Prot ou TrEMBL) ou à partir d'une séquence soumise. Le pI d'une protéine est calculé en utilisant les valeurs pK des acides aminés décrits par Bjellqvist et coll. (1993) qui ont été définis en examinant la migration de polypeptide entre pH 4,5 à 7,3 dans un environnement de gel à gradient de pH immobilisé avec 9,2 M et 9,8 M d'urée à 15°C ou 25°C. La prédiction de pI pour les protéines hautement basiques n'a pas été étudiée et il est possible que les prédictions actuelles de Compute pI / Mw ne reflètent pas entièrement la réalité.
 - **Translate** (<https://web.expasy.org/translate/>) est un outil qui donne les différentes séquences en acides aminés prédictibles à partir d'une séquence de nucléotides (ADN/ARN) en considérant les différents cadres de lecture.
 - **FindPept** (<http://www.expasy.org/tools/findpept.html>) identifie les peptides résultant d'un clivage non spécifique de protéines par leurs masses expérimentales, en tenant compte des modifications chimiques artéfactuelles, des modifications post-traductionnelles et du clivage autolytique des protéases. FindPept analyse une série de masses obtenues à partir de mesures de spectrométrie de masse et détecte quelles masses ne correspondent pas aux peptides avec des séquences prévisibles dictées par des règles de clivage. Ces masses sont ensuite comparées à celles des peptides qui peuvent théoriquement être obtenus par clivage en deux positions quelconques de la séquence protéique.
 - **PeptideCutter** (https://web.expasy.org/peptide_cutter/) prédit les sites potentiels de clivage par des protéases ou des produits chimiques dans une séquence protéique donnée. PeptideCutter renvoie la séquence d'interrogation en indiquant les sites de clivage potentiels.
 - **SIM** (<https://web.expasy.org/sim/>) est un outil d'alignement pour les séquences de protéines qui fonctionne à partir de deux séquences de protéines.
- **Clustal Omega** (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

Clustal Omega (EMBL-EBI) est aussi un outil d'alignement de séquences, mais à la différence de SIM, il demande au moins 3 séquences. Les figures d'alignement de ce travail de thèse ont été fait sur cet outil en ligne. Les séquences peuvent être alignées sur toute leur longueur (global alignement) ou seulement dans certaines régions (alignement local). Le premier programme Clustal a été écrit par Des Higgins en 1988. En 1992, une nouvelle version a été proposée, ClustalV, qui incorporait des

alignements de profil (alignements à partir d'alignements existants) et la possibilité de générer des arbres à partir de l'alignement multiple en utilisant la méthode « Neighbour-Joining ». La troisième génération de la série, ClustalW, publiée en 1994, a incorporé un certain nombre d'améliorations, comme la pondération de séquence, les pénalités d'écart spécifiques à la position et le choix automatique d'une matrice de comparaison de résidus appropriée à chaque étape de l'alignement multiple (Chenna et coll. 2003). ClustalW génère ainsi des cladogrammes ou des phylogrammes (figure 21).

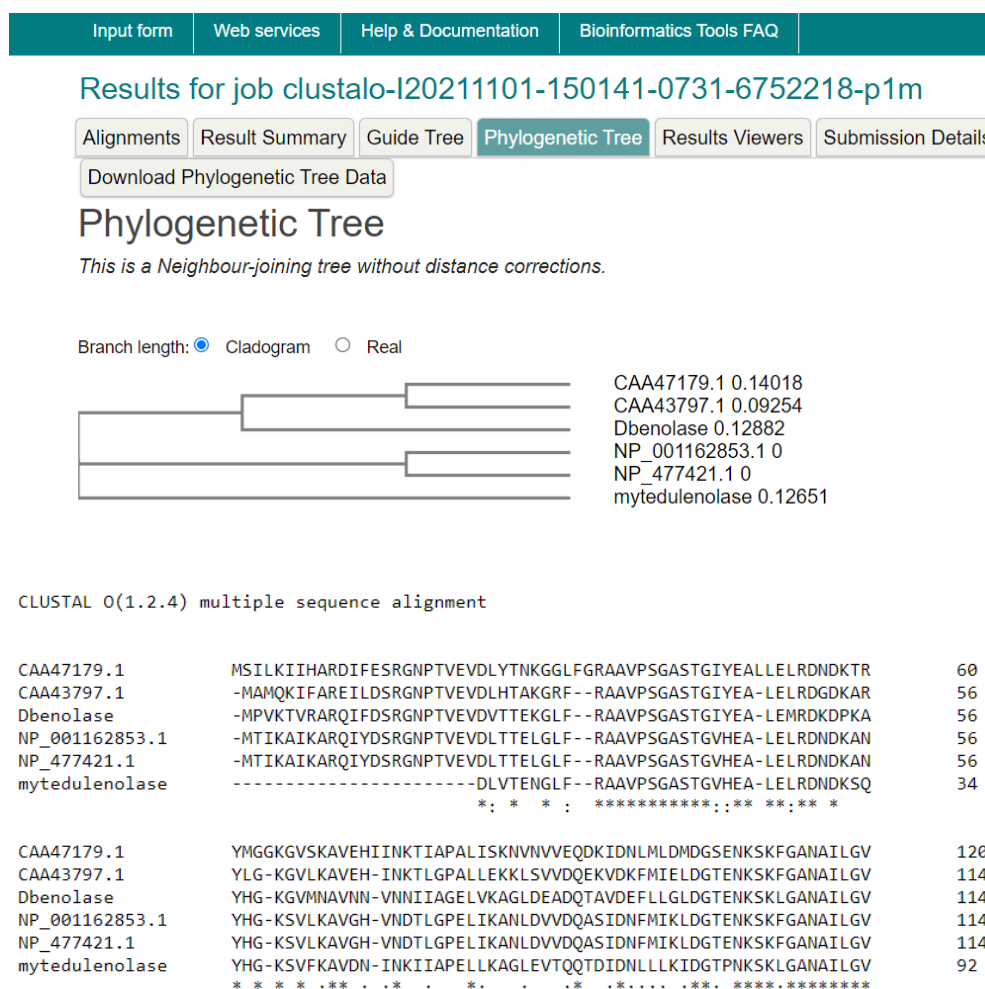


Figure 21 : Exemple de résultat obtenu avec Clustal Omega : les noms donnés aux séquences sont à gauche. Le nombre d'acides aminés est rappelé en fin de ligne. *Légende* : un astérisque indique les résidus conservés ; deux points (:) indiquent des résidus du même groupe de propriétés physicochimiques ; un point (.) indique une similarité.

II.2.3.2. Structures secondaires

- **NetsurfP** (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetSurfP-2.0>)

Netsurf est un outil permettant la prédiction des structures secondaires d'une séquence (Klausen et coll. 2019). Le serveur NetSurfP prédit aussi l'accessibilité de surface et la structure secondaire des

acides aminés dans une séquence protéique (figure 22). La méthode calcule aussi simultanément la fiabilité de chaque prédiction, sous la forme d'un Z-score. Le Z-score est lié à la prédiction d'accès à la surface. Cet outil a permis de conforter certaines hypothèses de troncature protéique par des acteurs enzymatiques.

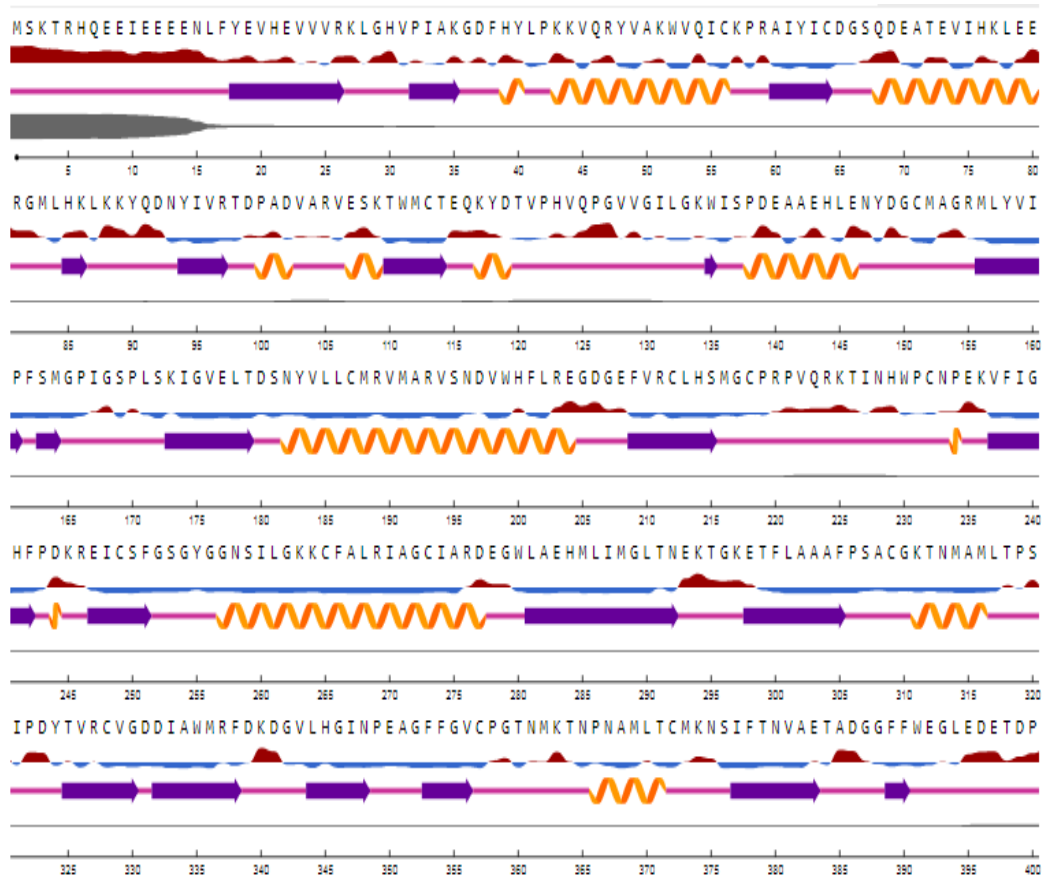


Figure 22 : Exemple de résultat obtenu par NetsurfP. *Légende :* 1^{ère} ligne, séquence en acides aminés. 2nde ligne : en rouge, zones à la surface de la protéine ; en bleu : zones d'enfouissement. 3^{ème} ligne : en rose, absence de structure secondaire ordonnée ; en violet, feuillets bêta ; en orange, hélices alpha. 4^{ème} ligne : l'épaisseur de la ligne grise rend compte du niveau de désordre. 5^{ème} ligne : positionnement des acides aminés de la partie N-terminale vers la partie C-terminale.

II.2.4. Les sites de clivages protéolytiques

- **TOpfind** (<https://topfind.clip.msl.ubc.ca/>)

La recherche des coupures sur les protéines peut se faire sur la base de données « Terminus Oriented Protein Function Inferred Database » (TopFIND) qui fournit une base de connaissances centrale intégrant des données sur les extrémités des protéines, leurs modifications et le contexte dans lesquelles elles ont été retrouvées (Lange, Huesgen, et Overall 2012). TopFIND permet ainsi d'étudier la distribution et la classification à l'échelle du protéome des extrémités N-terminales à travers les espèces ainsi que les caractéristiques des modifications d'acides aminés N-terminaux.

Dans cette base de données, chaque protéine est représentée par sa séquence polypeptidique codante avec en annotation les alias et une fonction protéique. Une annotation spécifique de séquence en tant qu'isoformes, domaines et variants de séquence est parfois disponible. TopFIND répertorie aussi des informations détaillées sur les chaînes protéiques, les terminaisons, les modifications des acides aminés terminaux et les processus protéolytiques. Des informations supplémentaires sur les modifications chimiques des acides aminés terminaux sont intégrées et référencées par rapport à l'ontologie PSI-MOD (PSI : **P**osition **S**pecific **I**terated) (<https://www.ebi.ac.uk/ols/ontologies/mod>). Chaque événement de clivage de chaîne protéique, terminaison, ou modification terminale répertorié dans TopFIND est accompagné de liens menant aux détails de l'expérience mettant en évidence ces clivages (Lange, Huesgen, et Overall 2012). Les informations sont structurées selon les critères de :

- Directivité : une mesure qualitative décrivant si le clivage ou l'extrémité signalée a été directement observée par exemple, une extrémité N-terminale identifiée par séquençage d'Edman ou des approches protéomiques telles que ATOMS (Amino-terminal oriented mass spectrometry of substrates).
- Pertinence physiologique : une mesure qualitative de la probabilité que l'extrémité, le clivage ou l'inhibition identifiée soient présents et pertinents *in vivo*. Les exemples qui peuvent être pris en compte dans cette classification précisent si le substrat a été identifié dans des échantillons de tissus ou des solutions, s'il est tissu spécifique et si la protéase est normalement présente dans une certaine cellule, un tissu ou un stade de développement.
- Valeur et type de confiance : une indication de probabilité.

Les séquences de protéines sont extraites d'UniProtKB (<https://www.uniprot.org/Swiss-Prot>) accessible aussi par l'adresse <https://www.expasy.org/resources/uniprotkb-swiss-prot>. Le numéro d'accès UniProt est utilisé comme identifiant unique et point de référence pour toutes les informations stockées ou générées par TopFIND et pour les références croisées à des ressources externes. Les informations d'annotation des protéines UniProtKB, y compris la fonction de la protéine, la séquence, les isoformes, les autres variants de séquence, les domaines, les modifications et les références croisées sont conservées pour chaque entrée (Lange, Huesgen, et Overall 2012).

- **MEROPS** (<http://merops.sanger.ac.uk>)

La base de données MEROPS (EMBL-EBI) est une source d'informations sur les sites de clivage des protéases. Cette base a été développée dans l'objectif de distinguer une peptidase d'une autre en identifiant leur spécificité en termes de sites de coupure, substrats et inhibiteur. La collection MEROPS a commencé en 1998 et s'est étoffée graduellement. Elle comptait 1919 sites de clivages dans la

version 7.8 (avril 2007) et recense actuellement plus de 92000 sites de clivage dont environ 82000 troncatures dans les protéines et les peptides naturels et plus de 6000 sites de clivages dans des substrats synthétiques (Rawlings et coll. 2018).

II.2.5. Les interactions protéines-protéines

- **String** (<https://string-db.org/>)

Le logiciel STRING (Szklarczyk et coll. 2019) permet d'étudier les réseaux protéiques et les interactions protéine-protéine pour visualiser ces réseaux. Les interactions ont été basées sur les données des espèces mammifères modèles les plus utilisés (rat, souris humain...) mais la conservation des séquences protéiques laisse à penser que les réseaux visualisés peuvent être transposables à nos espèces modèles. Pour chaque association protéine-protéine stockée dans STRING, un score est fourni. Ces scores, entre zéro et un, indiquent la probabilité estimée qu'une interaction donnée est biologiquement significative, spécifique et reproductible, compte tenu de la littérature disponible. Les interactions entre les protéines sont figurées par un trait gris dont l'épaisseur indique le niveau de confiance ; plus le trait est épais, plus le niveau de confiance est élevé (figure 23).

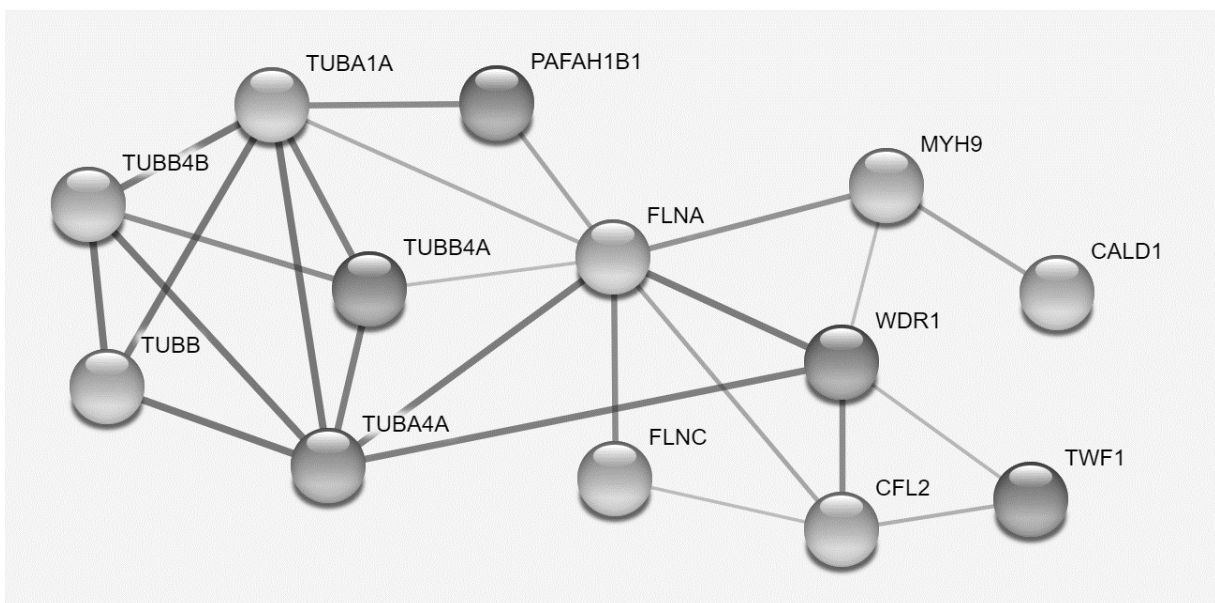


Figure 23 : Exemple de résultat obtenu sur STRING. Les cercles représentent les protéines et l'abréviation de chaque protéine est précisée ; les traits représentent les interactions entre les protéines et leur épaisseur indique le niveau de confiance associé. Les processus biologiques en termes GO peuvent être affichés sous forme de coloration des cercles ; ici aucun processus biologique n'a été sélectionné.

II.2.6. Les banques de données des multitâches

- **Moonprot** (<http://www.moonlightingproteins.org/>)

Cette base de données vise à centraliser des informations sur les protéines multifonctionnelles, c'est-à-dire assurant au moins deux fonctions. Elle rassemble des données sur les protéines pour lesquelles il existe des preuves biochimiques et/ou biophysiques que deux fonctions, ou plus, sont réalisées par la même protéine.

- **MultitaskProtDB-II** (<http://wallace.uab.es/multitaskII>)

MultitaskProtDB-II est une base de données de protéines multifonctionnelles comportant les informations suivantes : fonctions biologiques canoniques et additionnelles, organismes, états monomère/oligomère, numéros d'accèsion NCBI, UniProt et PDB (**P**rotein **D**ata **B**ank). La structure tridimensionnelle, l'implication des protéines dans les maladies humaines (78% des protéines moonlighting décrites sont humaines) et si la protéine est la cible d'un médicament actuel sont aussi stipulées.

- **MoonDB** (<http://moondb.hb.univ-amu.fr>)

MoonDB est une base de données regroupant des protéines multifonctionnelles connues et des protéines moonlighting sur cinq espèces modèles classiques (Ribeiro et coll. 2019). Elle contient environ 300 protéines avec les informations additionnelles suivantes : numéros d'accèsion UniProt et noms des gènes.

Les bases telles que MultitaskProtDB, MoonProt et MoonDB peuvent être utilisées comme des sources de données pour créer des modèles ou valider des hypothèses sur ces protéines. Ces bases de données contiennent près de 700 protéines moonlight démontrées expérimentalement, avec de nombreuses informations relatives à chacune d'entre elles, et constituent une ressource précieuse pour cette classe fascinante de protéines.

II.3. Synthèse de la procédure suivie

Le jeu de données de spectres de masse a été soumis à un pipeline d'analyse présenté dans la figure 24.

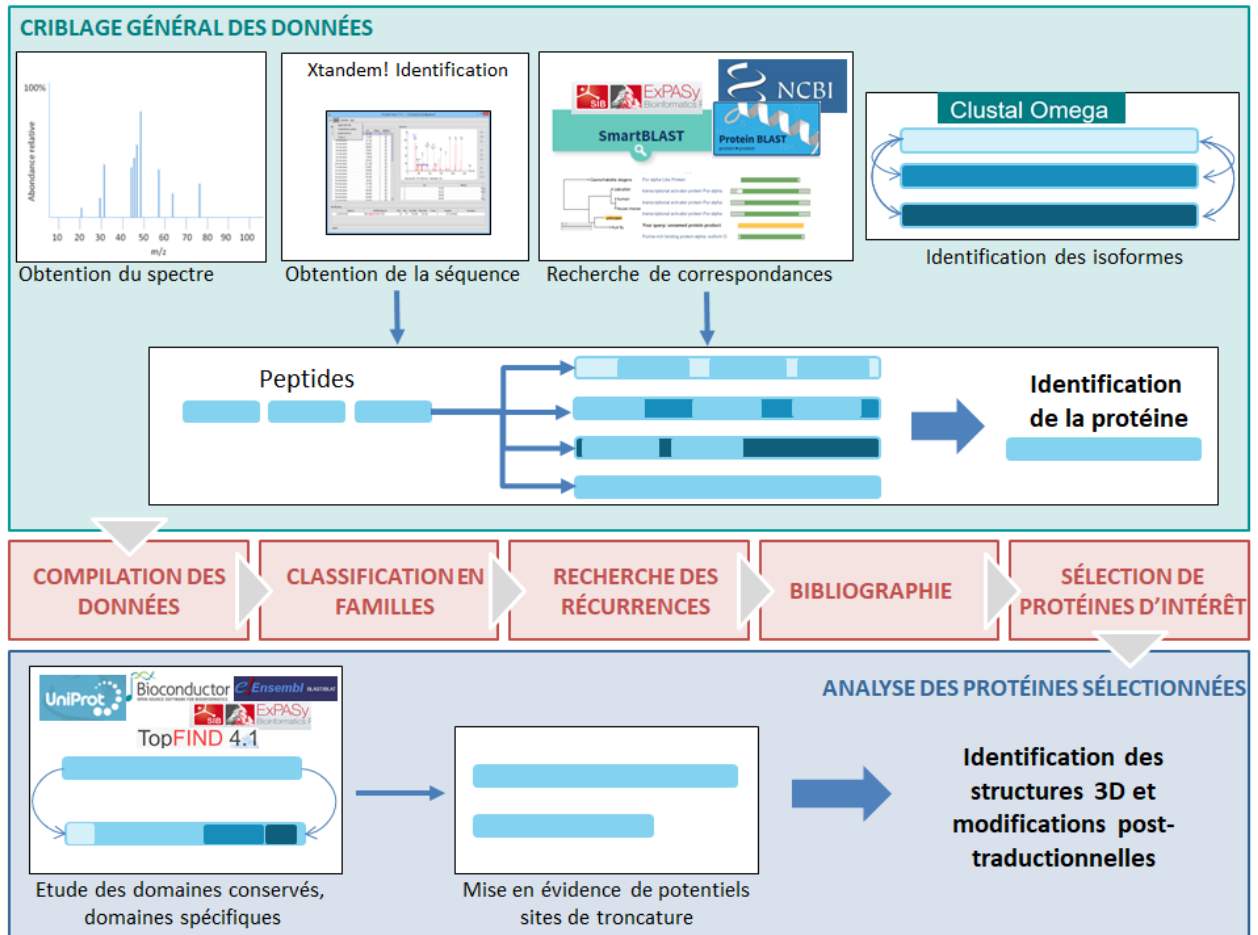


Figure 24 : Pipeline des analyses effectuées à partir des données protéomiques.

Résultats & Discussion

I. Criblage des données

Les résultats de cette étude se fondent sur plusieurs expériences réalisées entre 2008 et 2018 dans lesquelles un stress a été induit chez des bivalves. Ces études ont consisté à exposer une population d'animaux à un perturbateur physique ou chimique, puis à appliquer un protocole standardisé d'extraction et de séparation par électrophorèse bidimensionnelle des protéines branchiales. Les protéoformes présentant des variations significatives d'abondance ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse (voir matériels et méthodes). L'exploitation se base sur 6 jeux de données d'exposition chez des moules marines du genre *Mytilus sp.* et deux jeux de données d'exposition chez des moules d'eau douce du genre *Dreissena sp.* Les contaminants testés sont le polychlorobiphényle CB153, les hydrocarbures aromatiques polycycliques phénanthrène et benzo[a]pyrène et le cadmium. Le stress abiotique testé a été des élévations de température, avec des expositions sur des moules bleues provenant de deux sites en Baie de Seine, l'un très contaminé, Le Havre, l'autre moins contaminé, Yport et des moules bleues de la sous-espèce *Mytilus edulis platensis* des îles Kerguelen.

Comme annoncé précédemment, les données de départ incluent des ensembles d'analyse protéomique avec les images de gels, les tableurs d'analyse statistiques et des fichiers de spectrométrie de masse. Pour chaque expérimentation, les variations d'abondance relatives entre conditions contrôle et exposée sont déjà établies et les spectres de masse disponibles. Mon travail a été de repartir des fichiers de masse dont la description a été faite dans la partie Matériel de ce mémoire et de mettre à jour et compléter les informations d'identité des protéines afin de réaliser des tableurs de comparaison inter-manipulation.

Les premières identifications protéiques (séries 2008-2012) avaient été faites en utilisant des spectres de masse générés à partir d'un spectromètre de masse en tandem de type ESI TRAP (Système 6340 ion trap avec interface HPLC-chip cube, Agilent Technologies) avec interrogation dans les banques de données NCBIInr en utilisant le logiciel Mascot hébergé par le Centre de Ressources Informatiques de Haute-Normandie. Dans les banques NCBIInr initialement disponibles (10 157 076 séquences et 3 463 213 929 peptides au 12/12/2009), les données bivalves n'étaient que très partielles et incluses dans la taxonomie NCBIInr « other metazoan » comportant moins d'un million de séquences. Fin 2012, cette catégorie comportait 1 049 173 séquences pour un total dans NCBIInr de 21 985 448 séquences et 7 548 358 033 peptides. Entre 2012 et 2014, le nombre de séquences de la catégorie « other metazoan » est passé d'un million à près d'un million cinq cent mille (1 480 504 au 18/04/2014) avec une banque NCBIInr de 38 269 749 séquences et 13 613 875 934 peptides. En 2016, la catégorie « other metazoan » comptait plus de trois millions six cent mille séquences (3 665 971 séquences au 03/06/2016). Enfin, en 2021, ce chiffre est monté à plus de quatre millions sept cent mille séquences (4 788 854 séquences au 08/12/2021) et une catégorie « MOLLUSCA » de 969 400 séquences est désormais disponible. Cet enrichissement des bases de données explique une nette progression des identifications entre 2008 et 2018, le nombre de spectres identifiés passant de 60% à plus de 80 %. Un autre élément explique le succès des identifications protéiques sur les séries réalisées à partir de 2014. Elles ont en effet été faites en utilisant des

spectres de masse générés par un appareil de spectrométrie de masse en tandem de type Q-TOF équipé d'une source nanospray (Q-TOF 6520 avec nano-LC1200, Agilent Technologies) et analysées en utilisant le logiciel X!TANDEM directement avec des banques de transcriptomique de moules.

Entre les premières et les dernières séries, les résultats montrent également une amélioration des identifications en termes de nombre de peptides uniques, reflétant une meilleure précision des spectres de masse conjointement à l'enrichissement des banques de données (tableau 4).

Tableau 4 : Nombre de peptides uniques obtenus en retour d'identification MS.

Conditions	année	Nombre de peptides uniques		
		de 1 à 2	3	>10
HAP 7	2008	8	3	19
HAP 14	2008-2009	25	13	24
CB153	2009-2012	81	31	22
CAN3YP	2014	13	8	58
CAN3LH	2015-2016	7	2	91
STM21K	2016-2017	2	2	101
Cd7Pol	2017-2018	0	7	59
Cd7Bug	2017-2018	2	0	87

Légende - La colonne année fait référence à la période d'acquisition des spectres de masse. Les colonnes suivantes donnent le nombre d'identifications obtenu avec 1 à deux peptides uniques, puis avec 3 peptides uniques et enfin avec plus de 10 peptides uniques ; ce nombre est en net augmentation à partir de 2015. Les conditions comparées sont indiquées en première colonne : exposition de moules bleues à un mélange d'hydrocarbures aromatiques de 7 jours (HAP7) et de 14 jours (HAP14) ; exposition au polychlorobiphényle CB153 de 14 jours (CB153) ; exposition à des stress thermiques respectivement caniculaires de 3 jours (CAN3LH et CAN3YP) et modéré de 21 jours (STM21K) ; les lettres donnent la provenance des moules (K, Kerguelen, YP d'Yport, et LH du Havre,) ; exposition de 7 jours au cadmium, chez la moule zébrée (Cd7Pol) et chez la moule quagga (Cd7Bug).

Enfin, le pourcentage d'identification chez les mollusques bivalves, et en particulier chez *Mytilus sp.*, est en nette augmentation quand on compare les premiers résultats aux derniers acquis (tableau 5).

Tableau 5 : Nombre d'identifications obtenues chez les Mollusques

Conditions	année	Nbr id	Mollusques	dont Bivalves
HAP 7	2008	41	28	28
HAP 14	2008-2009	122	77	73
CB153	2009-2012	142	63	62
CAN3YP	2014	134	91	85
CAN3LH	2015-2016	112	81	78
STM21K	2016-2017	145	109	87
Cd7Pol	2017-2018	76	68	63
Cd7Bug	2017-2018	102	81	81

Légende - Les conditions comparées sont indiquées en première colonne : exposition de moules bleues à un mélange d'hydrocarbures aromatiques de 7 jours (HAP7) et de 14 jours (HAP14) ; exposition au polychlorobiphényle de 14 jours (CB153) ; exposition à des stress thermiques respectivement caniculaires de 3 jours (CAN3LH et CAN3YP) et modéré de 21 jours (STM21K) ; les lettres donnent la provenance des moules (K, Kerguelen, YP d'Yport, et LH du Havre,) ; exposition de 7 jours au cadmium, chez la moule zébrée (Cd7Pol) et chez la moule quagga (Cd7Bug). La colonne année fait référence à la période d'acquisition des spectres de masse. La colonne Nbr id indique le nombre de protéines identifiées. Les colonnes suivantes précisent le nombre d'identifications faites chez une espèce de Mollusques, et dans ce cas, chez un Bivalve.

Les acteurs communs entre les expérimentations ont ensuite été recherchés. Ainsi, la deuxième étape de mon travail a consisté à faire apparaître les acteurs protéiques présentant une variation d'abondance significative retrouvés plusieurs fois dans les différents jeux de données. Au total, sur l'ensemble des 918 DAP du set d'analyse (spots présentant une différence significative d'abondance entre les conditions exposées et témoin), 431 DAP récurrentes ont été identifiées. Au delà des identités fines de chaque DAP, des familles de protéines regroupant des éléments d'un même système (i.e sous-unités du protéasome), des isoformes proches (i.e. HSP70, HSC71) ou encore des protéoformes présentant une même identité mais des caractéristiques de poids moléculaire et/ou point isoélectrique variables (i.e. actine canonique et formes tronquées) ont été mises en évidence dans les tableaux de comparaison inter-manipulation. Il a donc été choisi de regrouper l'ensemble des DAP par famille afin d'améliorer la lisibilité des récurrences. Enfin, les familles de DAP ont été classées en groupes fonctionnels de protéines. De façon synthétique, ces DAP correspondent à une soixantaine de protéines appartenant à quatre grands groupes : les protéines chaperonnes intervenant dans le repliement et le maintien des conformations protéiques ainsi que leur recyclage (catégorie chaperonnes, tableau 6) ; l'actine et la tubuline avec des protéines associées à la dynamique des microfilaments et des microtubules (catégorie cytosquelette, tableau 6.) ; des enzymes participant à

l'équilibre redox de la cellule (catégorie détoxification et système anti-oxydant, tableau 6) ; et enfin, des enzymes impliquées dans le maintien de la production d'ATP (catégorie métabolisme énergétique, tableau 6).

Tableau 6 : Familles de protéines récurrentes et nature des variations d'abondance mesurées en fonction des expérimentations.

PROTEINES CHAPERONES								
Protein	STM21K	CAN3YP	CAN3LH	HAP7	HAP14	CB153	Cd7Pol	Cd7Bug
famille des HSPs	+	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -
proteasome subunits	+	+	-	+ / -	+ / -	+ / -	+	+ / -
protein disulfide-isomerases	+	+	+	+ / -	+ / -	+ / -	+	-
peptidyl-prolyl cis-trans isomerases	-	+	-	+ / -	+	+		
major vault protein		+	+	+	-	-	-	+
14-3-3 protein	+		+	+	-	+		-

CYTOSQUELETTE								
Protein	STM21K	CAN3YP	CAN3LH	HAP7	HAP14	CB153	Cd7Pol	Cd7Bug
actin subunits	+	-	+ / -	-	+	-		+ / -
actin related proteins	+	+	+	+ / -	+ / -	+ / -	+	
T-complex proteins		+		+ / -	-	-	+	+ / -
tubulin subunits	+	+	-	+ / -	+	-	+ / -	+ / -
tubulin related proteins		+	-	+	+	-	+ / -	+

DETOXICATION ET SYSTEME ANTIOXYDANT								
Protein	STM21K	CAN3YP	CAN3LH	HAP7	HAP14	CB153	Cd7Pol	Cd7Bug
aldehyde dehydrogenases		+ / -	-	-	-	-	+	
redoxins/thioredoxins	-	+ / -			+ / -	+ / -		-
superoxide dismutases			-		+	-	-	-

METABOLISME ENERGETIQUE								
Protein	STM21K	CAN3YP	CAN3LH	HAP7	HAP14	CB153	Cd7Pol	Cd7Bug
glycolytic enzymes	+	+	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -		+ / -
malate dehydrogenases	+	+	-	+ / -	+	-		+ / -
pyruvate dehydrogenase complex		-	-	+		-		
mitochondrial respiratory chain subunits	+	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+ / -	+	-
arginine kinase	-	-	+ / -	+	+ / -	+		
phosphoenolpyruvate carboxykinases		+	+	-			+ / -	+

Légende - Le tableau est subdivisé en quatre parties correspondant aux quatre grandes catégories fonctionnelles retrouvées : chaperonnes, cytosquelette, détoxification/système anti-oxydant et métabolisme énergétique. Les conditions comparées sont indiquées en première ligne : des stress thermiques respectivement modéré de 21 jours (STM21K) ou caniculaires de 3 jours (CAN3LH et CAN3YP), les lettres donnant la provenance des moules (K, Kerguelen, YP d'Yport, et LH du Havre,) ; des stress chimiques avec une exposition de moules bleues à un mélange d'hydrocarbures aromatiques de 7 jours (HAP7) et de 14 jours (HAP14) ; une exposition de 14 jours à un polychlorobiphényle (CB153) ; une exposition de 7 jours au cadmium de moules zébrées (Cd7Pol) et de moules quagga (Cd7Bug). La répartition des familles de DAP récurrentes (1^{ère} colonne, "protein") par expérimentation est indiquée par des cases colorées ; les cases blanches correspondent aux expérimentations pour lesquelles il n'y a pas de variation de DAP appartenant à la famille concernée. Un code couleur est associé aux sens de variation (exposé versus contrôle) : les cases rouges avec un "+" correspondent à une augmentation d'abondance, les cases bleues avec un "-" correspondent à une diminution d'abondance, les cases grises associées à "+/-" indiquent que des augmentations et des diminutions d'abondance ont été observées.

Il est à noter que, parmi les protéines compilées, se trouvent des HSP qui sont déjà utilisées en tant que biomarqueurs chez les mollusques bivalves, notamment dans les contextes de stress thermiques et de contaminations (Franzellitti et coll. 2020 ; Fabbri, Valbonesi, et Franzellitti 2008 ; Clayton, Steinmann, et Fent 2000)

Petrak et coll. (2008) ont publié un travail de synthèse recensant les protéines les plus retrouvées lors d'études comparatives en 2DE et a souligné que des méta-analyses protéomiques statistiquement robustes peuvent fournir des informations précieuses pour la recherche. En effet, une étude plus approfondie des éléments perturbés lors d'une rupture d'homéostasie pourraient en eux-mêmes servir de marqueurs d'une réponse stéréotypée au stress. L'auteur avance qu'une analyse globale des variations d'expression de protéines dans des contextes spécifiques basée sur un vaste ensemble de données, qui prendrait en compte la régulation positive ou négative de la protéine, pourrait fournir un nouvel outil pour disséquer les processus complexes de l'homéostasie cellulaire. Dans le contexte de cette thèse, l'étude réalisée est centrée sur l'impact du stress environnemental.

Il est remarquable de réaliser qu'un nombre important de protéines modifiées sous l'effet d'un stress appartient à la famille des housekeeping qui initialement étaient considérées comme non sujettes à régulation. De ce fait, analyser les protéines les plus communément retrouvées a été négligé. Or leurs modifications d'abondance ou de qualité a une pertinence biologique. Cela reflète un rôle « senseur », à savoir de signal d'alarme direct ou indirect après un stress. De plus, les stress étudiés étant d'intensités différentes (chronique, aigu, modéré), il est logique que le jeu de senseurs impliqué varie. En outre, plutôt que de considérer individuellement et de façon stricte une sous-unité ou une isoforme précise, nous avons ouvert la recherche de récurrence en considérant des familles ou groupes fonctionnels.

Les parties suivantes du document sont consacrées à la présentation des DAP récurrentes des 4 familles fonctionnelles. Chacune comporte une partie descriptive qui précise les structures et fonctions des DAP identifiées comme récurrentes, une partie indiquant les variations d'abondance observées dans le jeu de données traité et, enfin, une confrontation avec les données de la littérature. L'analyse est ainsi accompagnée d'une étude bibliographique visant à mieux comprendre les rôles des DAP identifiées comme récurrentes et à rechercher des modifications décrites en contexte de stress pour une mise en relation avec les variations observées dans les études réalisées au laboratoire. Dans la suite du document, tous les éléments traités sont des protéoformes dont l'abondance a varié significativement au cours de plusieurs expérimentations.

II. Les DAP intervenant dans les processus de protection, de repliement et de dégradation

De façon attendue, ces DAP sont pour une majorité d'entre elles impliquées dans la réponse générale au stress et déjà identifiées comme multi-tâches. Ainsi, 25 sont classées dans le processus biologique, GO 0006950, réponse au stress (figure 25). De plus, l'ensemble de ces protéines est relié dans un réseau d'interactions fonctionnelles comme le montre la figure 25 réalisée avec le logiciel String (Szklarczyk et coll. 2019 ; <https://string-db.org/Interactions>) où seule la Major vault protéine (MVP) fait figure à part. De fait, elle correspond à un élément original de ces travaux et fera l'objet d'une étude plus poussée (II.5. Les Major Vault Protéines).

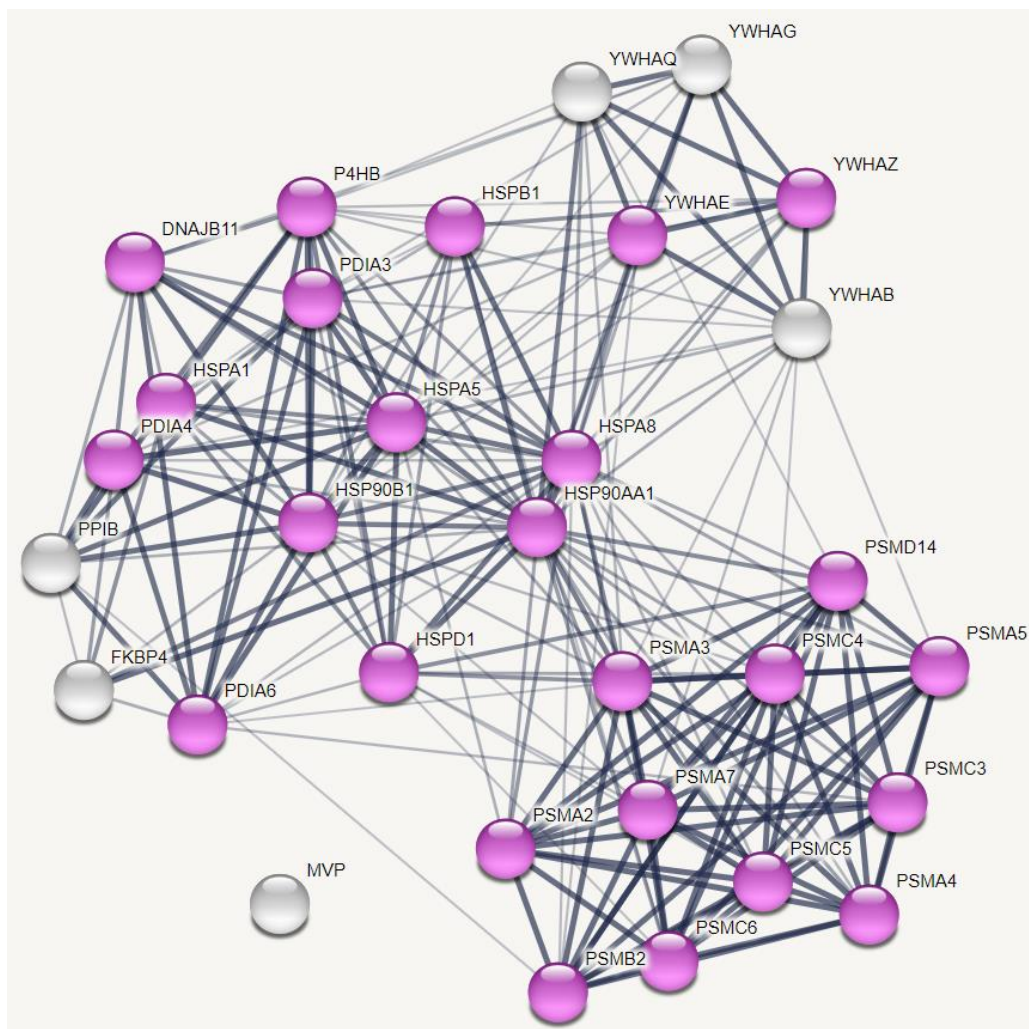


Figure 25 : String Interactions au sein de la catégorie CHAPERONNE. En rose, les protéines appartenant au même processus biologique : GO 0006950, Réponse au stress. L'épaisseur des traits représente le niveau de confiance des interactions détectées par String (<https://string-db.org/Interactions>).

II.1. Les DAP du stress thermique

II.1.1. Présentation des HSP

Les protéines du choc thermique, HSP (Heat Shock Proteins) sont une catégorie de protéines chaperonnes historiquement connues pour leur surexpression lors de stress cellulaires. Les protéines de choc thermique (HSP) ont été décrites pour la première fois par (Ritossa 1962) chez la drosophile en réponse à la température. Depuis, on sait que ces protéines chaperonnes jouent un rôle crucial dans le repliement/dépliage des protéines nouvellement synthétisées, l'assemblage de complexes multiprotéiques, le transport/tri des protéines dans les compartiments subcellulaires, le contrôle/signalisation du cycle cellulaire et la cytoprotection. Chez *H. sapiens*, les HSP sont séparées en sous-catégories dont les HSPA, HSPB et HSPD. Il existe aussi la classe DNAJ qui comprend les HSP 40. De façon générale, les HSP sont nommées en fonction de leur masse moléculaire : HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 et pour les formes plus petites un s précède l'abréviation HSP pour small HSP. Ces protéines sont très conservées au sein des eucaryotes, notamment chez les bivalves avec une conservation élevée des structures génomiques, y compris le nombre d'exons et les longueurs globales des gènes dans chaque sous-famille (Huihui Liu et coll. 2016). En général, la longueur totale de l'ensemble des familles HSP va de la plus courte, sHSP10 (306 pb chez *H. sapiens*) à la plus longue, HSP100 (10k pb chez *H. sapiens*) en passant par la sous-famille d'homologues DnaJ de la famille HSP40 (environ 6 à 7kbp).

Les HSPA comprennent différentes protéines dont le PM est de l'ordre de 70 kDa. Chez *H. sapiens*, il existe au moins 13 isoformes de HSP70 avec différentes localisations subcellulaires, qui ont une grande homologie de séquence et partagent la même structure de domaine, la principale forme inductible étant la HSPA1. La catégorie des HSP70 comprend aussi la GRP 78 (glucose-regulated protein 78) ou HSPA5, aussi connue sous le nom de BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein). La GRP78 comporte 654 acides aminés, dont les 18 résidus d'acides aminés N-terminaux fonctionnent comme un peptide signal du RE ciblant la protéine vers le RE et une extrémité C-terminale qui sert de séquence de rétention dans le RE. Cette protéine corrige le repliement, l'assemblage et prévient le transport de protéines ou de sous-unités protéiques mal repliées. Une isoforme cytosolique exprimée de manière constitutive, HSPA8, aussi nommée HSC71 ou HSC70, possède une identité de séquence de 66 % avec la GRP78. Les principales isoformes des protéines HSP90 de mammifères sont l'isoforme cytoplasmique inductible HSP90 alpha, HSP90AA1, l'isoforme cytoplasmique exprimée de manière constitutive HSP90b, HSP90AB1, et l'isoforme HSP90B1 également appelée endoplasmine, Grp94 ou GP96. Les HSP90 interagissent avec d'autres protéines afin de les activer ou de les stabiliser. Les HSPD

comprennent la famille HSP60 de chaperonnes (ou chaperonines) qui sont des protéines oligomériques classées en deux sous-familles avec le groupe I présent dans les bactéries, les mitochondries et les chloroplastes, et le groupe II qui se trouve dans le cytosol eucaryote et chez les archées. La sHSP10, co-chaperonne avec la HSP60 mitochondriale, est une protéine résidant dans les mitochondries, qui intervient dans l'assemblage, le désassemblage et le repliement des protéines. Sur le plan structurel, la HSP60 possède des modules fonctionnels et trois domaines structuraux formant un complexe tétradécamérique stable à double anneau. Elle se lie aux protéines non repliées et catalyse leur repliement d'une manière dépendante de l'ATP. Bien que la majorité des protéines HSPD résident dans les mitochondries, chez *H. sapiens* 15% à 20% des HSPD cellulaires se trouvent dans des sites extra-mitochondriaux, au niveau du cytosol ou en interaction avec la membrane cellulaire (Stefano et coll. 2009). La forme extra-mitochondriale présente une séquence d'adressage N-terminale de 26 acides aminés qui est clivée lors de l'importation dans les mitochondries. Enfin, les HSPB regroupent l'ensemble des familles de sHSP (small HSP) qui partagent un domaine α -cristallin d'environ 80 acides aminés et un poids moléculaire de l'ordre de 20 à 30 kDa. Parmi les HSPB, les HSPB1 sont des protéines d'environ 27 kDa qui ont la capacité de s'insérer entre les protéines, prévenant ainsi la formation d'agrégats.

II.1.2. Mise en évidence dans le jeu de données

La famille des HSPA est la plus représentée dans nos études avec 23 DAB identifiées comme HSP70 (HSPA1), la plupart correspondant à une induction (tableau 7). Seule l'étude HAP7 ne montre pas de variation significative des HSP70. Les variations de la HSC71 arrivent en deuxième place avec 18 DAB identifiées comme HSPA8. Il est notable que ces variations concernent uniquement le genre *Mytilus*. Il en va de même avec la GRP78 (HSPA5) avec 13 DAP. De façon générale, les variations des HSPA (HSP70, HSC71 et GRP78) ne vont pas toutes dans le même sens et le fait qu'elles concernent des protéoformes présentant des points isoélectriques et de poids molaires différents suggère des modifications post-traductionnelles de ces protéines, et en particulier, quand la modification touche surtout le point isoélectrique, des phosphorylations. Les variations des HSP90 sont observées dans seulement 6 études avec respectivement 7 protéoformes identifiées comme HSP90 α , 4 protéoformes identifiées comme GRP94 ; il en va de même pour les sHSP24 avec 12 DAP. Les protéoformes identifiées comme HSP60 sont au nombre de 8 et ne sont présentes que dans 4 études (HAP 7, CB 153, Cd7Bug et Cd7Pol). Dans ces études, les sens de variations ne sont pas toujours les mêmes, ce qui suggère une balance de régulation entre ces différentes HSP. A l'inverse, les protéoformes HSP40 (DNAJB11) montrent une augmentation d'abondance dans les 5 études (STM21K, CAN3YP, CAN3LH, HAP7 et Cd7Pol) où elles sont retrouvées.

Tableau 7 : Occurrences des DAP appartenant aux protéines de choc thermique.

HSP70 (HSPA1)											
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
STM21K	<i>M. e. p.</i>	1599	↑	74	5,1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04106.1	69515	5,35	10	5
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7197	↑	69	5,3	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAE51348.1	69848	5,35	44	42
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7207	↑	69	5,3	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAE51348.1	69848	5,35	17	11
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7209	↑	70	5,2	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI78531.1	71484	5,38	27	26
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7202	↑	69	5,2	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAE51348.1	69848	5,35	40	27
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7214	↑	69	5,4	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAE51348.1	69848	5,35	24	12
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7166	↑	71	5,6	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2234228.1	69889	5,57	20	16
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10826	↑	66	5,5	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	gi 66766196	76104	6,13	59	31
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10827	↑	66	5,4	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	gi 62989584	69848	5,35	40	26
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10828	↑	66	5,5	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	gi 76780610	69779	5,35	33	31
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10831	↑	67	5,4	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	gi 76780606	69814	5,36	65	55
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11056	↑	48	7,1	<i>Mytilus coruscus</i>	gi 553303828	71566	5,29	10	20
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11076	↑	46	7,7	<i>Mytilus coruscus</i>	gi 553303828	71566	5,29	10	24
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11142	↑	42	6,2	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	gi 66766196	76104	6,13	9	32
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11631	↑	27	6,1	<i>Azumapecten farreri</i>	gi 38683403	71217	5,33	9	22
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11646	↑	26	4,8	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	gi 57635269	71164	5,33	10	19
HAP 14	<i>M. e.</i>	845	↓	70	5,7	<i>Corbicula fluminea</i>	AHY03302.1	71401	5,40	26	8
CB153	<i>M. e.</i>	2167	↑	70	5,2	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	gi 76780606	69814	5,36	8	5
CB153	<i>M. e.</i>	2444	↓	44	7,3	<i>Mytilus coruscus</i>	gi 553303828	71566	5,29	10	24
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1184	↓	27	5,7	<i>Corbicula fluminea</i>	AHY03302.1	71401	5,40	26	8
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	291	↓	69	5,4	<i>Corbicula fluminea</i>	AHY03302.1	71401	5,40	53	27
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	382	↑	59	5,4	<i>Corbicula fluminea</i>	AHY03302.1	71401	5,40	35	17
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	346	↑	70	6,6	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022325720.1	65741	6,36	32	18

HSC 71 (HSPA8)											
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
STM21K	<i>M. e. p.</i>	1616	↑	71	5,1	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022288408.1	72778	6,65	14	13
STM21K	<i>M. e. p.</i>	1608	↑	70	5,2	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	51	28
CAN3YP	<i>M. e.</i>	8680	↓	24	5,8	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	14	18
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7485	↓	42	4,9	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	32	28
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7169	↑	72	5,1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	51	28
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7170	↑	72	5,2	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	50	52
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10791	↑	69	5,3	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	59	28
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11136	↓	43	5,0	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	41	15
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11140	↓	42	4,9	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	23	75
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11115	↓	43	5,1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI78531.1	71484	5,28	4	6
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10792	↑	69	5,3	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	46	52
HAP 7	<i>M. e.</i>	345	↑	72	5,0	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	17	8
HAP 14	<i>M. e.</i>	778	↓	75	5,3	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	21	10
HAP 14	<i>M. e.</i>	805	↑	71	5,6	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	46	51
HAP 14	<i>M. e.</i>	794	↑	72	5,2	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	46	51
HAP 14	<i>M. e.</i>	806	↑	71	5,6	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	46	51
CB153	<i>M. e.</i>	2146	↓	71	5,2	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	33	17
CB153	<i>M. e.</i>	2147	↓	71	5,3	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAH04109.1	71324	5,28	19	20

... / ...

GRP78 (HSPA5)											
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
STM21K	M. e. p.	1552	↑	79	5,0	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5402102.1	75091	5,18	29	28
CAN3YP	M. e.	7128	↑	80	4,8	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5402102.1	75091	5,18	29	18
CAN3YP	M. e.	7137	↑	80	4,9	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5402102.1	75091	5,18	12	28
CAN3YP	M. e.	7422	↓	46	4,6	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2227033.1	74738	5,04	21	19
HAP 7	M. e.	326	↑	75	4,8	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2227033.1	74738	5,04	10	8
HAP 7	M. e.	1330	↑	25	6,4	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2227033.1	74738	5,04	4	3
HAP 14	M. e.	721	↓	75	4,8	<i>Crassostrea gigas</i>	BAD15288.1	73075	5,02	16	19
HAP 14	M. e.	737	↑	75	5,0	<i>Crassostrea gigas</i>	BAD15288.1	73075	5,02	16	19
HAP 14	M. e.	753	↓	75	5,2	<i>Crassostrea gigas</i>	BAD15288.1	73075	5,02	16	19
CB153	M. e.	2105	↑	80	4,9	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2227033.1	74738	5,04	9	6
CAN3LH	M. e.	11161	↑	41	6,0	<i>Crassostrea gigas</i>	BAD15288.1	73075	5,02	7	13
CAN3LH	M. e.	11524	↑	30	4,4	<i>Crassostrea gigas</i>	BAD15288.1	73075	5,02	6	3
CAN3LH	M. e.	11700	↑	24	6,1	<i>Crassostrea gigas</i>	BAD15288.1	73075	5,02	4	3

HSP90 (HSP90AA1)											
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
STM21K	M. e. p.	1536	↑	89	5,1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAJ85741.1	83125	4,84	41	25
CAN3YP	M. e.	7129	↑	84	4,9	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAJ85741.1	83125	4,84	29	20
HAP 14	M. e.	686	↑	81	5,6	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAJ85741.1	83125	4,84	7	4
HAP 14	M. e.	696	↓	81	4,8	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAJ85741.1	83125	4,84	41	25
Cd7Bug	D. r. b.	615	↑	44	4,8	<i>Ruditapes philippinarum</i>	AHY27548.1	83262	4,85	23	14
Cd7Pol	D. p.	207	↓	86	5,0	<i>Corbicula fluminea</i>	AMM04544.1	83077	4,91	51	34
Cd7Pol	D. p.	211	↓	86	5,1	<i>Corbicula fluminea</i>	AMM04544.1	83077	4,91	28	16

GRP94 (HSP90B1)											
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
STM21K	M. e. p.	1454	↑	110	5,0	<i>Crassostrea gigas</i>	BAF63637.1	91624	4,83	49	54
HAP 7	M. e.	238	↑	95	4,8	<i>Crassostrea gigas</i>	BAF63637.1	91624	4,83	7	9
HAP 7	M. e.	1276	↓	17	5,1	<i>Crassostrea gigas</i>	BAF63637.1	91624	4,83	2	3
Cd7Pol	D. p.	159	↓	90	5,1	<i>Crassostrea gigas</i>	BAF63637.1	91624	4,83	37	27

sHSP24 (HSPB1)											
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
CAN3YP	M. e.	7743	↑	27	5,4	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AEP02968.1	28538	5,61	35	13
CAN3YP	M. e.	7764	↑	28	5,7	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AEP02968.1	28538	5,61	31	15
CAN3YP	M. e.	7775	↑	27	5,7	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AEP02968.1	28538	5,61	23	7
CAN3YP	M. e.	7895	↓	23	5,9	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2203243.1	27791	5,51	24	13
CAN3LH	M. e.	11433	↑	31	5,5	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2203243.1	27791	5,51	25	13
CAN3LH	M. e.	11435	↑	31	5,3	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2203243.1	27791	5,51	15	6
CAN3LH	M. e.	11436	↑	31	5,4	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2203243.1	27791	5,51	15	10
CAN3LH	M. e.	11860	↓	18	4,9	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AEP02968.1	28538	5,61	12	3
HAP 7	M. e.	897	↓	27	5,6	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2203243.1	27791	5,51	27	15
HAP 14	M. e.	1524	↓	29	5,3	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2203243.1	27791	5,51	15	6
CB153	M. e.	2807	↑	25	5,5	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AEP02968.1	28538	5,61	9	2
Cd7Pol	D. p.	817	↑	38	6,5	<i>Mercenaria mercenaria</i>	XP_045175088.1	37270	6,37	66	25

... / ...

HSP60 (HSPD1)											
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pI _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pI	% cov.	pep.
HAP 7	<i>M. e.</i>	495	↓	60	5,1	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5366635.1	61732	5,42	21	5
CB153	<i>M. e.</i>	2237	↓	61	5,2	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5366635.1	61732	5,42	21	5
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	376	↓	60	5,3	<i>Ruditapes philippinarum</i>	AMY16439.1	61253	5,25	72	50
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	546	↑	47	5,5	<i>Ruditapes philippinarum</i>	AMY16439.1	61253	5,25	22	12
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	815	↓	35	5,1	<i>Ruditapes philippinarum</i>	AMY16439.1	61253	5,25	12	6
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	550	↑	47	5,7	<i>Ruditapes philippinarum</i>	AMY16439.1	61253	5,25	33	14
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	2519	↑	54	5,4	<i>Ruditapes philippinarum</i>	AMY16439.1	61253	5,25	47	21
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	260	↑	77	6,0	<i>Mya arenaria</i>	AAP78491.2	75665	6,3	27	23

HSP40 (DNAJB11)											
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pI _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pI	% cov.	pep.
STM21K	<i>M. e. p.</i>	1917	↑	41	5,1	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021363546.1	41068	5,68	9	6
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7475	↑	44	5,6	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2235556.1	41037	5,64	31	10
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11107	↑	44	5,7	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2235556.1	41037	5,64	3	15
HAP 7	<i>M. e.</i>	671	↑	47	5,6	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021363546.1	41068	5,68	9	6
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	705	↑	42	5,7	<i>Mercenaria mercenaria</i>	XP_045177498.1	40613	5,44	53	15

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e. p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r.*, *bugensis*) ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs}. est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pI_{obs}. le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pI son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

II.1.3. Confrontation avec la littérature

Les protéines de choc thermique reviennent systématiquement lors des études écotoxicologiques protéomiques chez les bivalves. En particulier, l'équipe de Tomanek a étudié la modification de la HSP70 chez les moules ainsi que des sHSP lors de stress thermiques (Vasquez, Martinez, et Tomanek 2020 ; Tomanek 2012; Tomanek et coll. 2012). Des variations de multiples isoformes de HSP sont observées lors de stress thermiques aigus et chroniques ainsi que suite à un stress hypo-osmotique. De plus, chez les bivalves, des protéoformes de séquence plus courtes ont déjà été mises en évidence après des stress thermiques ou suite à une exposition à des métaux lourds (Péden et coll. 2014 ; Piano 2004).

Concernant l'HSP40, alias DNAJB11, Chen et coll. (2017) ont mis en évidence chez l'Homme une modification de conformation des oligomères de DNAJB11 en homotétramère, au lieu du dimère décrit classiquement. Ils avancent que la tétramérisation de DNAJB11 offre de nombreux avantages qui pourraient faciliter son rôle dans la régulation de la protéostase sécrétoire, en l'absence et en présence du stress du RE. En effet, la DNAJB11 tétramérique contient quatre domaines de liaison au substrat qui

seraient tous disponibles pour s'engager dans les régions hydrophobes des protéines mal repliées. Ils concluent enfin que cela démontre que cet assemblage tétramérique est important pour le rôle de DNAJB11 dans la coordination de la synthèse des protéines, en particulier sécrétoire, dans des conditions de stress du RE.

Chez l'huître, Piano (2004) et ses collaborateurs mettent en évidence dans la glande digestive et les branchies, des protéines « cytoprotectrices » après une exposition à un choc thermique ou sous l'effet du cadmium et du zinc. Ainsi, les huîtres exposées à différentes concentrations de Cd (entre 100 et 500 mg/L/j) pendant 7 jours montrent une augmentation dose-dépendante de l'expression de la HSP70 dans leurs branchies par rapport aux animaux témoins. La mise en évidence d'isoformes HSP70 modifiées (une forme à 69 kDa et une autre à 77 kDa) appuie l'idée de l'existence de plusieurs formes inductibles de HSP70. Ivanina et coll. (2012) ont mis en évidence un effet à court terme de l'exposition au Cd avec une augmentation dose-dépendante de la synthèse de HSP60 et de HSP70, mais pas de HSP90, chez *Crassostrea virginica*.

En conclusion, les HSP sont des acteurs incontournables de la réponse au stress. De plus, elles sont présentes dans différents compartiments où elles n'exercent pas le même rôle. Chez les vertébrés, elles auraient ainsi une fonction moonlight dans le milieu extracellulaire, telle que celle de Récepteur de surface de plasminogène pour l'HSP70 (Jeffery 2018). De plus, les HSP70 peuvent être des facteurs de transcription capables de moduler l'expression de cytokines (Ghazaei 2017).

II.2. Les DAP appartenant au protéasome

II.2.1. Présentation du protéasome

Le protéasome 26S est un complexe multiprotéique impliqué dans le système ubiquitine-protéasome (UPS), via la dégradation dépendante de l'ATP des protéines ubiquitinylées. Il a la capacité de cliver les protéines qui peuvent entrer dans son ouverture étroite après dépliement. Ce complexe est composé de deux parties indépendantes, le protéasome 20S et le protéasome 19S qui seront détaillés successivement. Il existe aussi un complexe 11S décrit chez l'humain et composé de 7 sous-unités. Le protéasome 26S joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie des protéines en supprimant les protéines mal repliées ou endommagées qui pourraient altérer les fonctions cellulaires et en éliminant les protéines à durée de vie courte, participant ainsi à la régulation de leur concentration. Par conséquent, le protéasome intervient dans de nombreux processus cellulaires, y compris la progression du cycle cellulaire, l'apoptose ou la réparation des dommages à l'ADN. L'adressage au protéasome est conféré par la fixation covalente de chaînes de polyubiquitine sur des

radicaux Lysines. Les différentes associations des complexes 20S, 19S et 11S peuvent former au moins six sous-types de protéasomes (Sakata, Eisele, et Baumeister 2021). De façon générale, les assemblages de protéasomes conduisent à la formation de structures dédiées à une protéolyse ciblée non lysosomale aboutissant à la dégradation rapide des protéines.

Le protéasome 20S est la partie protéolytique principale et forme un organite d'une centaine de nanomètres composé de quatre anneaux empilés. Les deux anneaux périphériques sont chacun formés de 7 sous-unités α permettant l'insertion de la chaîne protéique à dégrader. Les deux anneaux centraux comprennent chacun 7 sous-unités β à activité protéolytique. Les anneaux α du protéasome sont assemblés en premier et servent d'échafaudage pour soutenir et ordonner les sous-unités β . Le protéasome 20S peut fonctionner sous sa forme libre, non coiffée du 19S. En outre, 3 sous-unités β sont actives catalytiquement, à savoir la sous-unité bêta 1 ($\beta 1$) qui présente une activité de type caspase, la sous-unité bêta 2 ($\beta 2$) qui présente une activité de type trypsine et la sous-unité bêta 5 ($\beta 5$) qui a une activité de type chymotrypsine (Dwivedi, Yaniv, et Sharon 2021).

Le sous-complexe 19S compose la partie supérieure du protéasome 26S et constitue un centre de tri par lequel passe les protéines ubiquitinylées. Il comporte des protéines régulatrices dépendantes ou non de l'ATP (respectivement Rpt et Rpn). Les sous-unités Rpn remplissent des fonctions à la fois dans la reconnaissance des substrats polyubiquitinylés et dans leur désubiquitylation avant dépliage et translocation dans la particule centrale 20S. Elles coordonnent également les mouvements nécessaires au positionnement précis du protéasome 20S pour le traitement du substrat. Rpn1 et Rpn2, qui sont les plus grandes sous-unités du 19 S, sont composées d'un toroïde construit à partir de 11 motifs protéasome-cyclosome ; ils se fixent aux bobines enroulées des dimères Rpt1 / Rpt2 et Rpt6 / Rpt3, respectivement (Sakata, Eisele, et Baumeister 2021). Les sous-unités Rpt au nombre de 6, forment un anneau moteur AAA+ATPase nécessaire pour le dépliage des substrats, l'ouverture du passage et la translocation des substrats dans la zone centrale du 20S. Les Rpt ont une fonction de chaperonne dans la mesure où elles accompagnent le dépliement des protéines à travers le complexe protéasome. La structure 19S peut se dissocier et se réassocier avec plusieurs configurations : des assemblages des Rpt ou des hétérodimères composés des Rpn1, Rpn2, Rpn13 voire Rpn10, et enfin un sous-complexe contenant les sous-unités non ATPase restantes (Sakata, Eisele, et Baumeister 2021).

II.2.2. Mise en évidence dans le jeu de données

Sur les 8 études, de nombreuses protéoformes appartenant aux sous-unités du protéasome sont retrouvées de façon assez récurrente (tableau 8). Concernant, le protéasome 20S, 9 spots correspondant à des sous-unités α sont modifiés dans 6 études et seulement 2 identifications correspondent à une sous-unité β , plus précisément à l'isoforme $\beta 2$. Les sens de variations

d'abondance des sous-unités du protéasome 20S sont dans l'ensemble variables avec une tendance à une diminution de la sous-unité $\alpha 2$ et une augmentation des autres sous-unités. Des éléments du protéasome 19S sont aussi modifiés dans plusieurs études. Il s'agit le plus souvent de l'élément Rpn11 et des Rpt4 et Rpt6. Alors que la variation d'abondance de l'élément Rpn11 est différente selon les protéoformes détectées et les expériences, les Rpt4 sont augmentées et, inversement les Rpt6 présentent une diminution de leur abondance.

Tableau 8 : Occurrences des DAP appartenant au protéasome.

Composants du protéasome														
	Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pI _{obs}	GeneC.	abrev.	Espèce de criblage	Ref.	PM	pI	% cov.	pep
19S	CAN3YP	<i>M. e.</i>	7405	↑	47	5,1	PSMC3	19S RPT 5	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDH90580.1	47861	5,11	33	39
	HAP 14	<i>M. e.</i>	1167	↓	45	5,10	PSMC3	19S RPT 5	<i>A. aegypti</i>	gi 157129681	47953	5,20	17	6
	HAP 14	<i>M. e.</i>	1140	↓	47	5,2	PSMC4	19S RPT 3	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_011441086.1	47263	5,18	10	3
	HAP 7	<i>M. e.</i>	692	↓	44	7,2	PSMC5	19S RPT 6	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021376235.1	47738	8,67	45	20
	HAP 14	<i>M. e.</i>	1294	↓	40	7,8	PSMC5	19S RPT 6	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021376235.1	47738	8,67	45	20
	CB153	<i>M. e.</i>	2493	↓	42	7,4	PSMC5	19S RPT 6	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5401899.1	45503	6,79	44	20
	CB153	<i>M. e.</i>	429	↑	40	5,9	PSMC6	19S RPT 4	<i>Daphnia pulex</i>	gi 321461635	44199	6,10	22	6
	Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	673	↑	41	6,2	PSMC6	19S RPT 4	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022332857.1	44546	6,03	51	16
	Cd7Pol	<i>D. p.</i>	766	↑	40	5,9	PSMC6	19S RPT 4	<i>Mercenaria mercenaria</i>	XP_045187076.1	44320	6,59	32	11
	HAP 7	<i>M. e.</i>	831	↓	32	6,5	PSMD14	19S RPN11	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2218778.1	34180	6,56	9	3
	HAP 7	<i>M. e.</i>	1253	↑	30	7,0	PSMD14	19S RPN11	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011429048.1	34708	6,06	31	7
	HAP 14	<i>M. e.</i>	1423	↓	30	6,10	PSMD14	19S RPN 11	<i>S. kowalevskii</i>	gi 291239801	34852	6,07	9	3
	Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	851	↑	34	6,1	PSMD14	19S RPN11	<i>Octopus bimaculoides</i>	XP_014781213.1	34746	6,20	49	9
20S	CB153	<i>M. e.</i>	2923	↓	23	6,00	PSMA2	alpha 2	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2250769.1	26038	5,74	22	60
	Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1137	↓	27	5,49	PSMA2	alpha 2	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_034321686.1	26236	5,72	73	20
	CAN3YP	<i>M. e.</i>	7828	↑	25	5,60	PSMA3	alpha 3	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021370576.1	27844	5,26	23	7
	HAP 7	<i>M. e.</i>	906	↑	26	5,90	PSMA4	alpha 4	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2193748.1	28650	9,15	16	4
	Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1058	↑	28	5,54	PSMA4	alpha 4	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011419473.1	28601	5,91	45	8
	CAN3LH	<i>M. e.</i>	11497	↓	30	4,93	PSMA5	alpha 5	<i>Aplysia californica</i>	gi 524910383	26763	5,05	28	9
	HAP 7	<i>M. e.</i>	912	↑	26	4,80	PSMA5	alpha 5	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021360390.1	26542	4,96	2	8
	HAP 14	<i>M. e.</i>	1525	↑	29	4,80	PSMA5	alpha 5	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021360390.1	26542	4,96	8	2
	HAP 7	<i>M. e.</i>	1284	↑	28	4,50	PSMA7	alpha 7	<i>Apis mellifera</i>	gi 48142173	28274	8,6	5	1
	HAP 7	<i>M. e.</i>	1246	↑	21	5,90	PSMB2	beta 2	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2241533.1	22653	6,14	30	8
	CB153	<i>M. e.</i>	2980	↓	21	5,50	PSMB2	beta 2	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2241533.1	22653	6,14	13	2

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e. p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r. bugensis*) ; GeneC sa référence GeneCards ; abrev, l'alias utilisé dans le document ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs}. est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pI_{obs}. le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pI son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

II.2.3. Confrontation avec la littérature

II.2.3.1. Modifications du protéasome 20S

Dans nos études, les modifications de protéines appartenant au 20S affectent avant tout les sous-unités α de ce complexe, avec seulement deux modifications de sous-unités β détectées. La modification systématique de sous-unités α participe d'une réponse caractéristique au stress dans

laquelle ces sous-unités agiraient en stabilisant les sous-unités β nécessaires à une protéolyse. Il existe des protéasomes 20S qui contiennent des stœchiométries alternatives des sous-unités α . Différentes conditions aboutissent ainsi à la formation de protéasomes $\alpha 4$ - $\alpha 4$ comme la sous-expression de $\alpha 3$ ou la surexpression de $\alpha 4$. Ces formes alternatives peuvent être retrouvées en réponse à des stimuli environnementaux tels que le stress oxydant (Budenholzer et coll. 2017). De plus, isolées, les sous-unités $\alpha 7$ humaines peuvent former des doubles structures cycliques heptamériques, qui se désassemblent facilement lors de l'introduction de sous-unités $\alpha 6$. Des substitutions par des sous-unité α ont été documentées dans d'autres études (Hammack et Kusmierczyk 2017). Les mécanismes par lesquels se produisent les assemblages alternatifs de protéasomes 20S demeurent encore à éclaircir (Budenholzer et coll. 2017).

Yasuda et coll. (2020) ont révélé un regroupement de sous-unités du protéasome 26S dans le noyau lors d'un stress osmotique de cellules *in vitro*. De plus, Huang et coll. (2018) ont mis en évidence une capacité de liaison à l'ARN de plusieurs sous-unités α et β . La translocation entre compartiments révèle des fonctions secondaires qui pourraient être caractéristiques de processus d'adaptation à des changements du milieu.

II.2.3.2. Modifications du protéasome 19S

Le criblage des données du laboratoire fait principalement ressortir parmi les éléments du protéasome 19S, les sous-unités Rpt4, Rpt5 et Rpn11.

La sous-unité Rpt4 est peu étudiée en dehors de son implication canonique dans la particule régulatrice du 19S. Cette protéine d'environ 44kDa s'apparente à une chaperonne permettant la désagrégation de protéines non-fonctionnelles et une aide au retour à une conformation correcte (Braun et coll. 1999). Néanmoins, elle est étudiée en tant que biomarqueur en cancérologie puisque sa surexpression est corrélée avec une invasion rapide de cellules dans des lignées de cellules humaines issue de cancers du côlon (Boland et coll. 2016). Dans ces lignées cellulaires, Rpt4 inhibe la fonction caspase et trypsine des sous-unités β lorsqu'elle est activée et son knock-out provoque une inhibition de la prolifération cellulaire. Plus précisément, la transfection de cellules HCT-116 avec l'ARN interférant ciblant Rpt4 induit une régulation positive significative de l'ARNm codant GRP78, un marqueur du stress du réticulum endoplasmique et cible de l'UPR. Ce résultat a été confirmé au niveau traductionnel, avec une augmentation de la protéine GRP78 et, en parallèle, une accumulation de protéines polyubiquitinylées dans les cellules HCT116 après knock-out du gène Rpt4 (Boland et coll. 2016).

Rpt5 est l'une des protéines formant l'anneau à l'entrée du canal formé par le 20S. Cette protéine a un poids moléculaire d'autour de 49 kDa, dépendant de l'espèce. Le domaine C-Terminal de cette protéine s'insère dans l'espace entre deux sous-unités α du 20S et leurs interactions permettent l'ouverture ou la fermeture du canal central du 20S. Des expériences de knock-out de cette protéine chez des levures mettent en évidence un domaine d'environ 12 acides aminés qui entrent en jeu dans l'insertion (S. Y.-C. Lee, De La Mota-Peynado, et Roelofs 2011). Une étude *in vitro* avec un peptide de synthèse a permis une suractivation du protéasome 26S (Gillette et coll. 2008). De plus, Gillette et ses collaborateurs ont montré que Rpt2 et Rpt5 seules suffisent pour activer le protéasome 20S. En conclusion, la mise en évidence dans nos travaux de modifications de Rpt5 pointe une protéine essentielle à la protéolyse.

Rpn11 est positionnée directement au-dessus de l'anneau d'entrée des substrats du 19S. Sous forme d'hétérodimère Rpn8 / Rpn11 purifié, Rpn11 est une sous-unité très polyvalente qui clive efficacement divers types de chaînes de polyubiquitine. Cette activité de désubiquitylation est ATP-dépendante. Elle favorise la translocation des substrats à travers la structure 19S. Cependant, une fois incorporé dans le protéasome, l'efficacité de clivage de Rpn11 est fortement réduite et Rpn11 a un rôle plus structural. Dans sa structure, Rpn11 contient deux régions en boucle qui s'étendent à partir de son domaine N-terminal replié. Le positionnement de ces boucles est similaire à celui des protéines désubiquitylantes impliquées dans le trafic endosomal. Toutefois, les deux boucles de Rpn11 présentent des différences intéressantes avec ses homologues endosomales. La première est d'une importance particulière pour Rpn11 car elle subit des transitions conformationnelles entre les états inactif et actif. Ces états ont été définis par analyse cristallographique des complexes dimères Rpn11 / Rpn8 (de Poot, Tian, et Finley 2017). Lorsque le couvercle 19S est incorporé dans le protéasome 26S, la partie N-terminale de Rpn11 dans l'hétérodimère Rpn8 / Rpn11 tourne à 90 degrés, ce qui entraîne une perturbation des sites de contact Rpn11 / Rpn5 et Rpn8 / Rpn9 et le positionnement de Rpn11 à côté du port d'entrée du substrat. Les expériences *in vitro* sur protéasomes purifiés montrent qu'en l'absence d'activité Rpn11, la dégradation du substrat est fortement réduite (de Poot, Tian, et Finley 2017). Une sous-expression de la protéine Rpn11 mènerait donc à un ralentissement direct de la protéolyse. Cet effet direct du changement de quantité de Rpn11 révèle des fonctions secondaires qui pourraient être représentatives d'une réponse générale au stress. D'ailleurs, Verma et coll. (2002) mettent en évidence une troncature de la protéine dans des plasmides de type mpr1-1 et posent l'hypothèse que cette protéine aurait un rôle secondaire dans la médiation de la régulation transcriptionnelle et dans la réparation de l'ADN. Une expérience de knock-out de Rpn11, réalisée par les mêmes auteurs, a provoqué un blocage des cellules en phase G1 impliquant un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (Verma et coll. 2002).

II.2.3.3. Données en écotoxicologie chez les bivalves

Si le protéasome est bien décrit en termes de rôles et structures, il est en outre régulièrement mis en évidence dans des études écotoxicologiques réalisées sur des modèles bivalves. Ainsi, une expérience de stress thermique (32°C pendant 1h) réalisée chez *M. galloprovincialis* sur des individus provenant d'eaux tempérées, a mis en évidence de nombreuses modifications du protéasome, dont des sous-expressions des sous-unités α (1) et β (2, 3 et 6) (Tomanek 2012). De plus, la même étude, réalisée chez *M. trossulus*, une espèce adaptée aux températures froides, montre des modifications inversées de ces protéines. Par ailleurs, des surexpressions des sous-unités α (4, 6 et 2) et β (3) ont été observées chez *M. galloprovincialis* après exposition à un mélange de cadmium et d'arsenic, dénotant une réaction impliquant le protéasome 20 S différente de celle observée lors d'un stress thermique (H. Wu et coll. 2016a).

Par ailleurs, des moules du genre *Mytilus* ont présenté des modifications d'expression d'éléments Rpn ainsi que des éléments du 20S majoritairement surexprimés lors de stress à plusieurs métaux lourds (Cd, Cu et Zn) (Varotto et coll. 2013). Une exposition à un ignifuge organophosphoré le TDCPP réalisée chez *M. galloprovincialis* a montré des modifications d'éléments du protéasome dont des sous-unités α , β , Rpn2, Rpn10, Rpn6, Rpn11 ainsi que Rpt5 (Sánchez-Marín et coll. 2021). Chez *D. polymorpha*, une double modification des sous-unités Rpn (Rpn11 diminué et Rpn8 augmenté) est retrouvée lors d'une exposition à des microplastiques de polystyrène (S. Magni et coll. 2019a). Varotto et coll. (2013) ont mis en évidence, dans les branchies de moule, des modifications du protéasome au niveau transcriptionnel lors d'une exposition à un mélange de métaux lourds (Cd, Cu et Hg). Ces résultats confirment l'importance du protéasome dans la réponse au stress.

En conclusion, cette étude montre que les variations des composants du protéasome sont des indicateurs d'un protéome de stress, avec des modifications d'abondance associées à des ruptures d'homéostasie cellulaire. Une recherche bibliographique dans des études en écotoxicologie chez les bivalves confirme ce résultat et met en avant un rôle particulier de Rpn11 et des sous-unités $\alpha 2$ et $\alpha 4$ du protéasome 20S.

II.3. Les DAP protéines disulfide isomérases

II.3.1 Présentation des PDI

Les protéines disulfide isomérases (PDI) sont une famille multifonctionnelle de protéines à activité oxydoréductase thiol-disulfure présentant quatre domaines de type thioredoxine. De façon générale, les PDI fonctionnent comme des chaperonnes moléculaires qui empêchent la formation d'agrégats protéiques présentant des défauts dans leur réarrangement tridimensionnel. L'activité d'échange et d'isomérisation des thiol-disulfures des PDI est une activité importante des PDI. Lorsque ses cystéines catalytiques sont réduites, la PDI est capable de réagir avec des disulfures non natifs présents sur des protéines pour former un complexe de disulfure mixte. La PDI catalyse ensuite le réarrangement des liaisons disulfures mal formées via des réactions d'isomérisation. La PDIA1, aussi appelé P4HB (prolyl 4-hydroxylase subunit beta), contient une séquence d'adressage au RE où elle fonctionne en association avec BiP/ GRP78. Elle intervient dans le repliement des protéines en favorisant la formation de ponts disulfures.

II.3.2. Mise en évidence dans le jeu de données

Des variations de PDI sont retrouvées dans toutes les études avec des isoformes et des variations d'abondance, cependant différentes selon l'étude (tableau 9). A titre d'exemple, la PDIA6 est sous-exprimée après 7 jours d'exposition aux HAP mais sur-exprimée dans les études CAN3YP, CB153 et Cd7Pol. De façon remarquable, les protéoformes identifiés comme PDIA3 présentent une augmentation d'abondance dans toutes les études où elles ont été détectées, à la fois après les expositions aux stress thermiques STM21K, CAN3YP, CAN3LH et après exposition de 7 et 14 jours au mélange d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, HAP 7 et HAP 14. Chez *M. edulis*, les protéoformes PDIA3 sont de poids moléculaire similaire mais distinctes par leur pI, formant un train de spots caractéristiques de modifications post-traductionnelles de type phosphorylation.

Tableau 9 : Occurrences des DAP protéines disulfide isomérases (PDI)

les PDI												
Etude	Espèce	ID	GeneC	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
STM21K	<i>M. e. p.</i>	1791	PDIA3	↑	52	6,0	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	gi 291240569	54633	6,29	12	7
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7326	PDIA3	↑	52	6,0	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI57500.1	54972	6,45	3	7
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7370	PDIA6	↑	48	5,4	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI56051.1	44271	5,53	49	31
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10972	PDIA3	↑	53	6,0	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI57500.1	54972	6,45	21	16
HAP 7	<i>M. e.</i>	582	PDIA3	↑	52	5,9	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	gi 291240569	54633	6,29	12	7
HAP 7	<i>M. e.</i>	1340	PDIA3	↑	52	6,1	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022329914.1	55841	5,49	18	15
HAP 7	<i>M. e.</i>	375	PDIA4	↓	71	5,5	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022309872.1	71591	5,17	16	18
HAP 7	<i>M. e.</i>	609	PDIA6	↓	50	5,3	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI56051.1	44271	5,53	38	29
HAP 14	<i>M. e.</i>	1038	PDIA	↓	52	5,9	<i>Haliotis discus discus</i>	gi 126697420	55486	4,56	6	8
HAP 14	<i>M. e.</i>	1080	PDIA3	↑	52	6,0	<i>Oreochromis niloticus</i>	gi 348535980	55619	5,73	4	3
CB153	<i>M. e.</i>	2147	PDIA4	↓	71	5,3	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDH91747.1	70822	5,37	12	10
CB153	<i>M. e.</i>	2355	PDIA6	↑	50	5,3	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI56051.1	44271	5,53	38	29
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	748	P4HB	↓	38	4,7	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022317112.1	58827	6,61	33	14
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	645	PDIA6	↑	44	5,6	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5386042.1	55498	5,09	36	13

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e. p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r.*, *bugensis*) ; GeneC sa référence GeneCards ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs} est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pl_{obs} le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pl son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

II.3.3. Confrontation avec la littérature

Dans une revue, Parakh et Atkin (2015) rappellent que la PDI peut subir des modifications post-traductionnelles au niveau de cystéines, cibles des régulations du système redox. En cas de perte de fonction de la PDI, de mauvais repliements des protéines sont possibles. En outre, l'accumulation de PDI au niveau de la jonction RE-mitochondrie déclenche l'apoptose via la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie.

Une autre revue sur la PDI recense les éléments démontrant qu'elle est multifonctionnelle et concluent que sa localisation dans plusieurs compartiments associée à son activité redox, lui permettent de jouer un rôle dans l'internalisation de certains pathogènes (Ali Khan et Mutus, 2014). La PDI favorise l'augmentation des ROS dans les cellules, ce qui a été également observé par d'autres auteurs : Fernandes et coll. (2009) dans le muscle lisse humain ; Victor, Sarada, et Ramkumar (2021) dans une revue portant sur les liens entre RE et stress oxydant.

Chez les bivalves, Leung et coll. (2011) ont exposé des moules vertes *Perna perna* à 0,5 ppm de Cadmium ou de H₂O₂ pendant 28 jours et observent une augmentation d'une PDI à partir de 14 jours d'exposition, avec une surexpression de la PDI plus forte dans le groupe traité au Cd que dans le groupe traité au H₂O₂. L'analyse de leurs données les amène à la conclusion que l'abondance de la PDI est corrélée avec le niveau de stress du RE. Zheng et coll. (2018) ont testé les effets de l'exposition de

moules *Perna viridis* à des algues responsables d'efflorescences et mettent en évidence une sous-expression de la PDI. Après une exposition à des nanoparticules d'argent pendant 21 jours, Duroudier et coll. (2019b) observent, dans la glande digestive de moules *M. galloprovincialis*, une augmentation de la PDIA4. Chez la même espèce, Détrée et Gallardo-Escárate (2018), lors d'une exposition à une gamme de 0,2 à 1mg/L de microplastiques, relèvent une augmentation de l'expression du messenger de la PDIA3, à la fois dans le manteau et dans la glande digestive.

En conclusion, ces études confortent nos résultats et montrent que les variations des PDI sont des indicateurs d'un protéome de stress et mettent en avant des modifications en corrélation avec le stress du RE.

II.4. Les DAP peptidyl-prolyl cis-trans isomérases

II.4.1. Présentation des peptidyl-prolyl cis-trans isomérases

Les peptidyl-prolyl cis-trans isomérases (PPIases) sont des enzymes de la catégorie des foldases, chaperonnes moléculaires ATP dépendantes, catégorie à laquelle appartiennent également les PDI rencontrées plus haut. Les PPIases sont présentes chez les vertébrés, les invertébrés, les plantes et les bactéries dans la plupart des compartiments cellulaires des tissus. Elles sont structurellement conservées au cours de l'évolution, et presque toutes les PPIases identifiées ont une activité enzymatique d'isomérisation cis-trans de peptidyl-prolyl. Ces enzymes catalysent l'isomérisation entre les formes cis et trans des liaisons peptidiques, qui sont associées à la conformation du polypeptide par la rotation autour d'une liaison prolyl. En modifiant les changements de conformation des protéines, les PPIases modulent l'accessibilité de groupes fonctionnels et par conséquent sont une étape de régulation supplémentaire dans des cascades physiologiques.

Chez l'Homme, il existe trois familles de PPIases : les cyclophilines, les parvulines et les protéines de liaison au FK506 (FKBP). Les PPIases sont des protéines très abondantes ; par exemple, les cyclophilines représentent environ 0,4 % de la masse sèche des protéines cellulaires (Koletsky, Harding, et Handschumacher 1986). En général, les domaines PPIase sont composés de 100 à 120 acides aminés qui forment une structure centrale composée de feuillets β . Dans les FKBP, cette structure centrale est un feuillet β à cinq brins qui s'enroule autour d'une hélice α , formant une cavité hydrophobe où se fixent les inhibiteurs et les éventuels substrats. Dans les cyclophilines, un tonneau de feuillets β antiparallèles à huit brins est entouré de chaque côté par une hélice α . Enfin, dans les parvulines, le cœur du feuillet β est entouré de quatre α -hélices. Chez la moule, les familles n'ont pas été distinguées et une étude des isoformes de ces protéines serait à mener.

II.4.2. Mise en évidence dans le jeu de données

Seules les études impliquant le genre *Mytilus* font apparaître des variations d'abondance de peptidyl-prolyl cis-trans isomérases avec à la fois des augmentations et des diminutions dans les conditions testées (tableau 10). Deux isoformes de PPlases sont retrouvées, la FKBP4 et la PPIB, cette dernière de façon plus systématique. La PPIB est ainsi retrouvée dans les études STM21K, CAN3YP, CAN3LH, HAP7 et CB153. La FKBP4 est sous-exprimée après 7 jours d'exposition aux HAP mais sur-exprimée dans l'étude STM21K. On remarque ainsi que lorsque les deux isoformes sont modifiées de façon concomitante, leurs sens de variation sont opposés (STM21K et HAP avec des variations contraires dans les deux cas), suggérant une régulation de type compensation.

Tableau 10 : Occurrences des DAP peptidyl-prolyl cis-trans isomérases (PPlases)

les peptidyl-prolyl cis-trans isomérases												
Etude	Espèce	ID	GeneC.	Var.	PM _{obs}	pI _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pI	% cov.	pep.
STM21K	<i>M. e. p.</i>	1756	FKBP4	↑	56	5,1	<i>Pomacea canaliculata</i>	XP_025087425.1	52961	5,45	32	15
STM21K	<i>M. e. p.</i>	2241	PPIB	↓	26	7,3	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5408011.1	27775	7,02	50	21
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7818	PPIB	↑	26	6,9	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2217533.1	26428	6,53	34	15
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7834	PPIB	↑	25	6,9	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5408011.1	27775	7,02	34	15
CAN3LH	<i>M. e.</i>	12865	PPIB	↓	30	7,1	<i>Crassostrea gigas</i>	gi 405963687	23840	5,97	14	18
HAP 7	<i>M. e.</i>	549	FKBP4	↓	53	5,3	<i>Pomacea canaliculata</i>	XP_025087425.1	52961	5,45	30	17
HAP 7	<i>M. e.</i>	895	PPIB	↑	27	6,0	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2217533.1	26428	6,53	30	6
HAP 14	<i>M. e.</i>	1637	PPIB	↑	21	6,1	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2236984.1	22080	5,77	28	6
CB153	<i>M. e.</i>	2868	PPIB	↑	23	6,9	<i>Crassostrea gigas</i>	ABY27347.1	14731	5,29	8	1

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e.p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r. bugensis*) ; GeneC sa référence GeneCards ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs} est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pl_{obs} le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pl son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

II.4.3. Confrontation avec la littérature

Les PPlases sont connues pour leur expression différentielle. Chez les procaryotes et les eucaryotes, plusieurs PPlases sont régulées par des facteurs de stress (Ünal et Steinert 2014). Dans une revue, Ishikawa, Boudko, et Bächinger (2015) rappellent que les PPlases sont des catalyseurs du repliement des protéines mais leurs fonctions sont beaucoup plus larges et souvent multifformes : les PPlases localisées dans le RE rugueux reconnaissent des substrats spécifiques et facilitent leur repliement (elles sont fréquemment trouvées dans le cadre de complexes avec d'autres folding

protéines) ; elles régulent spécifiquement les fonctions de ces complexes en agissant soit en tant qu'enzyme à activité PPlase, soit en tant que chaperonne moléculaire ou cofacteur (Ishikawa, Boudko, et Bächinger 2015). Chez l'Homme, Lin et coll. (2019) ont mis en évidence une corrélation entre activité PPlase à la surface des cellules et le développement de la matrice extracellulaire. Cette observation leur a permis de conclure que comme les PPlases peuvent catalyser le réarrangement dynamique du réseau dense de polymères de la matrice extracellulaire, elles peuvent également affecter l'interaction dynamique entre les cellules et la matrice extracellulaire.

Chez les bivalves, des perturbations de l'abondance des PPlases ont été décrites à plusieurs reprises. A titre d'exemple, sur un suivi de 8 mois réalisé sur des moules provenant de 3 sites présentant des niveaux différents de contamination aux métaux lourds, Helmholz et coll. (2015) ont observé une augmentation de PPlase sur le site le plus contaminé. Après exposition de 4 semaines de moules bleues à des conditions d'hypo-osmolarité et/ou à de contamination au propranolol (1g/L), Campos et coll. (2016) ont observé dans les branchies une diminution systématique d'abondance des PPlases. Une injection de *Vibrio anguillarum* et *Micrococcus luteus* dans le muscle adducteur de *Mytilus galloprovincialis*, a conduit 24h post-injection à une diminution des PPlases (Ji, Wu, Wei, Zhao, Wang, et coll. 2013). Ces résultats confortent l'implication régulière des PPlases en situation de stress avec des variations qui ne répondent pas à un schéma unique.

II.5. Les DAP protéines 14-3-3

II.5.1. Présentation des protéines 14-3-3

Les 14-3-3, également appelées Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophane 5-Monooxygenase Activation Proteins, servent de protéines adaptatrices régulant la transduction du signal en se liant à des motifs de phosphosérine et phosphothréonine. Ce sont des protéines dimériques hautement conservées dans le règne du vivant. Chaque monomère d'environ 30 kDa contient neuf hélices α créant une structure rigide capable de se dimériser et formant alors une coupe pouvant accueillir un ligand protéique (Yaffe 2002). La multiplicité des interactions est liée à l'existence de plusieurs isoformes de la protéine 14-3-3 avec la formation aussi bien d'homodimères que d'hétérodimères (Pennington et coll. 2018). Les sites phosphorylés sur les peptides et les protéines cibles s'ancrent directement dans chaque côté d'une rainure interne, qui contient les résidus les plus invariants parmi les isoformes 14-3-3. Plus une protéine présente de motifs consensus, plus elle se liera étroitement avec la 14-3-3 adaptatrice correspondante (Mackintosh 2004). Les hélices N-terminales des deux sous-unités se contactent et forment le fond d'une rainure centrale, tandis que les hélices C-terminales forment ses parois. Dans certaines isoformes 14-3-3, une boucle C-terminale, désordonnée dans la structure

cristalline, peut former une dixième hélice qui régule l'accès des partenaires de liaison à la rainure centrale (Mackintosh 2004).

Sept isoformes de 14-3-3 ont été décrites chez l'homme α/β , ϵ , θ , δ/ζ , τ , γ et σ et ces isoformes peuvent être plus ou moins conservées à travers les métazoaires, même si certains amibozoaires ne présentent qu'une seule forme de la protéine et qu'il n'existe que deux isoformes chez *Drosophila melanogaster* (Gardino, Smerdon, et Yaffe 2006 ; Toker et coll. 1992 ; Knetsch et coll. 1997). Chez les mammifères, les 14-3-3 protéines sont tissu-spécifiques et les différences de structure sont surtout au niveau des hélices N-terminales qui contiennent des séquences d'acides aminés très variées. Par conséquent, chaque isoforme exerce une affinité de dimérisation différente des autres, ce qui permet aussi de les différencier. A titre d'exemple, la 14-3-3 ϵ est fortement exprimée dans le cerveau, les lymphoblastes, les adipocytes et les testicules des moutons (Toker et coll. 1992). L'isoforme 14-3-3 γ est fortement exprimée dans le cerveau, les muscles squelettiques, le cœur et les cellules souches embryonnaires chez *H. sapiens*. De nombreuses études réalisées chez les plantes et les animaux mettent également en évidence des expressions tissu-spécifiques des isoformes de 14-3-3 (Pennington et coll. 2018). Cependant chez certaines espèces, la différence entre les isoformes est moins claire, au point où les auteurs font référence à la famille 14-3-3 sans spécifier l'isoforme. C'est souvent le cas dans les études portant sur les mollusques.

Les rôles établis des 14-3-3 protéines incluent l'activation des tryptophane/tyrosine hydroxylases, la régulation de l'activité de la protéine kinase C, la stimulation de l'exocytose dépendante du calcium (Gardino, Smerdon, et Yaffe 2006) et l'activation par l'hôte d'un facteur ADP-ribosyltransférase sous l'effet d'une infection par des bactéries (Fu, Coburn, et Collier 1993). Les 14-3-3 protéines modulent ainsi la transduction du signal, le trafic et la sécrétion de molécules par formation de complexes protéiques conduisant après modification du ligand, à la séquestration de ce ligand dans le cytoplasme, inhibant sa liaison avec des partenaires spécifiques présents dans le compartiment nucléaire ou dans la mitochondrie (Obsilova et coll. 2005). A l'inverse, une localisation nucléaire peut être observée pour certaines isoformes, dont la 14-3-3 ζ qui est capable de lier des histones (Pennington et coll. 2018).

Des enzymes du métabolisme possèdent des sites de liaison aux protéines 14-3-3 rendant ces sites moins accessibles aux phosphatases ou aux kinases et, de ce fait, modulant les voies de régulation de ces enzymes par le jeu des phosphorylation/déphosphorylation. Les protéines 14-3-3 peuvent ainsi réguler les activités de ces enzymes dans différentes situations métaboliques. A titre d'exemple, une liaison phosphorylation-dépendante de 14-3-3 au CRTC (cAMP-regulated transcriptional co-activator) est inhibitrice de la néoglucogenèse *in vitro* dans des conditions apoptotiques (Kleppe et coll. 2011 ; Screatton et coll. 2004).

Il a été démontré que les 14-3-3 sont capables d'inhiber l'autophagie par l'inhibition de la phosphatidylinositol-3-kinase de classe III (PI3K-III), qui est nécessaire à la nucléation des vésicules de l'autophagosome. Les protéines 14-3-3 sont également partenaires dans des interactions avec des membres de la famille des protéines BCL-2 (B-cell lymphoma 2), tels que la molécule anti-apoptotique BAD (BCL2 associated agonist of cell death), antagoniste de Bcl-2 et BIM (BCL-2-like protein 11), un médiateur de la cascade apoptotique passant par BCL-2 (Kleppe et coll. 2011).

II.5.2. Mise en évidence dans le jeu de données des protéines 14-3-3

Sur l'ensemble des études, 12 DAP ont été identifiées comme membres de la famille des protéines 14-3-3 (tableau 11). Dans la majorité des cas, chez *Mytilus edulis*, une augmentation de l'abondance des protéines 14-3-3 est observée que ce soit sous l'effet d'un stress thermique modéré (spot 2188 et 2194) comme caniculaire (spot 11432) ou après 7 jours d'exposition au mélange d'hydrocarbures polycycliques (spots 877, 878 et 891) comme après 14 jours d'exposition au CB153 (spot 2785). A l'inverse, à la suite de l'exposition de 14 jours au mélange d'hydrocarbures polycycliques, deux protéoformes identifiées comme 14-3-3 protéines mais localisées à des points isoélectriques différents (spots 1492 et 1500) présentent une diminution d'abondance, suggérant des modifications post-traductionnelles de cette protéine. Enfin, chez *D. r. bugensis*, les spots 985, 1119 et 1066 ont été identifiés comme une 14-3-3 protéine avec pour le premier spot, une réduction significative alors que les 2 autres DAP sont augmentées.

Tableau 11 : Occurrences des DAP protéines 14-3-3

les 14-3-3 protéines												
Etude	Espèce	ID	GeneC.	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
STM21K	<i>M. e.</i>	2188	YWHAE	↑	30	4,5	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5419505.1	29228	4,72	14	7
STM21K	<i>M. e. p.</i>	2194	YWHAE	↑	28	4,7	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5419505.1	29228	4,72	27	13
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11432	YWHA	↑	32	5,0	<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	gi 155966250	28466	4,67	5	2
HAP 7	<i>M. e.</i>	877	YWHAE	↑	29	4,6	<i>Danio rerio</i>	NP_997770.1	29073	4,65	37	18
HAP 7	<i>M. e.</i>	878	YWHAE	↑	29	4,7	<i>Danio rerio</i>	NP_997770.1	29073	4,65	37	18
HAP 7	<i>M. e.</i>	891	YWHAZ	↑	28	4,6	<i>Gouania willdenowi</i>	XP_028326659.1	27655	4,86	19	18
HAP 14	<i>M. e.</i>	1492	YWHAE	↓	28	3,5	<i>Bombyx mori</i>	gi 148298752	29767	4,66	15	4
HAP 14	<i>M. e.</i>	1500	YWHAE	↓	29	5,2	<i>Bombyx mori</i>	gi 148298752	29767	4,66	12	4
CB153	<i>M. e.</i>	2785	YWHAB	↑	26	4,6	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2229503.1	28950	4,73	14	2
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	985	YWHAE	↓	30	4,7	<i>Araneus ventricosus</i>	GBM10370.1	29249	4,69	71	20
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1119	YWHAE	↑	27	5,2	<i>Araneus ventricosus</i>	GBM10370.1	29249	4,69	25	6
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1066	YWHAG	↑	28	4,9	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022330197.1	28650	4,86	72	20

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e.p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r. bugensis*) ; GeneC sa référence GeneCards ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs} est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pl_{obs} le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pl son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

Mgal	ILNSPDRACRLAKAAFDEAISELDALSEESYKDSLIMQLLRDNLTLWTSMDMQGEDTEQK	261
Medu	ILNSPDRACRLAKAAFDEAISELDALSEESYKDSLIMQLLRDNLTLWTSMDMQGEDTEQK	243
Mcor	ILNSPDRACRLAKAAFDEAISELDALSEESYKDSLIMQLLRDNLTLWTSMDMQGEDTEQK	243
Cgig	ILNSPDRACRLAKAAFDDAIAELDSLSEESYKDSLIMQLLRDNLTLWTSMDMQGEDSEQR	243
Cvir	ILNSPDRACRLAKAAFDDAIAELDSLSEESYKDSLIMQLLRDNLTLWTSMDMQGEDSEQR	243
Miyes	ILNSADRACSVAKTAFDDAIAELDSLNEESYKDSLIMQLLRDNLTLWTADMSVKDGDEQ	287
Memer	ILNSPVDACQLAKKAFDAAIAALDSLNEESYKDSLIMQLLRDNLTLWTSMDMPQDDAD-Q	244
Dpol	ILNSPDRACRLAKSAFDDAIAELDNLNEDNYKDSLIMQLLRDNLTLWTSMDMAQDGDADQ	247
Dbug	ILNSPDRACRLAKSAFDDAIAELDNLNEDNYKDSLIMQLLRDNLTLWTSMDMAQDGDADQ	243
	**** ** : ** ** ** ** * . * : . ***** : ** .. :	
Mgal	Q-EQVQDLEGEDAS--	274
Medu	Q-EQVQDLEGEDAS--	256
Mcor	Q-EQVQDLEGEDAS--	256
Cgig	GGEQLQDVEQEES--	256
Cvir	GGEQLQDVEQEES--	256
Miyes	AVQRPEDIEGEQEES	302
Memer	QKEQVQDVEGGEDAS	259
Dpol	PKEQVEDIEAEDQS--	261
Dbug	PKEQVEDIEAEDQS--	257
	.. : * : *	

Cet alignement montre que, parmi les 8 séquences comparées, celles de *Mercenaria mercenaria* et *Mizuhopecten yessoensis* se distinguent de celles de *M. edulis*, *M. coruscus* et des dreissènes, particulièrement dans la première partie de la protéine. En outre, un même début de séquence « MADRE » est retrouvé chez plusieurs espèces, dont *M. edulis* et *D. r. bugensis*. Cette étiquette, proche du « MDDRE » de la 14-3-3 epsilon humaine et la présence d'une zone C terminale typique, amènent à l'hypothèse d'isoformes epsilon. Pour souligner cet argument, 4 isoformes humaine de 14-3-3 ont été alignées ci-dessous (figure 28).

Epsilon	DGEEQNKEALQDVEDENQ	255
Eta	EEAGEGN-----	246
Alpha/beta	DEGDAGEGEN-----	246
Theta	EECDAAEGAEN-----	245
	: :	

Figure 28 : Alignement ClustalOmega des séquences peptidiques de 4 isoformes de 14-3-3 chez l'Homme. **Légende :** "*", résidus conservés / ":", résidus partageant les mêmes propriétés physicochimiques / ".", résidus présentant une similarité.

En conclusion, les protéines 14-3-3 identifiées sont probablement majoritairement des isoformes epsilon mais l'implication d'une autre isoforme n'est pas exclue. De plus, la présence de toutes les isoformes 14-3-3 chez les mollusques n'est pas confirmée.

II.5.3. Confrontation avec la littérature

Chez *H. sapiens*, les protéines 14-3-3, et en particulier l'isoforme epsilon, sont impliquées dans la chimiorésistance. L'isoforme ϵ semble avoir un rôle de commutateur conférant une résistance à l'apoptose lors de stress modérés et, inversement, favorisant la mort cellulaire lors de stress intenses et chroniques. Par ailleurs, la 14-3-3 epsilon interagit avec les sous-unités du protéasome et restreint son activité dans les cellules de myélome multiple. Chez *H. sapiens*, la surexpression de 14-3-3 ϵ est considérée comme un marqueur à mauvais pronostic pour de nombreux cancers (Pennington et coll. 2018).

Des variations des 14-3-3 protéines ont été décrites dans plusieurs études environnementales. Ainsi, des travaux se sont intéressés à *Fucus vesiculosus*, une algue des zones intertidales, tolérante à l'eau douce et connue pour sa résistance aux métaux toxiques. Owen et coll. (2012) ont construit et analysé une banque d'ADNc à partir d'algues soumises à une exposition chronique au cuivre. Cela leur a permis d'identifier un transcrite codant une protéine 14-3-3. Une caractérisation du profil d'expression de ce messenger en réponse à une exposition au cuivre a ensuite été effectuée (3 à 600 $\mu\text{g/L}$, 11 jours). Une surexpression est observée en réponse aux faibles doses (3-30 $\mu\text{g/L}$) et aucune variation significative par rapport aux contrôles lors de l'exposition à 300 $\mu\text{g/L}$. Les auteurs avancent comme hypothèse qu'une exposition modérée au cuivre induit une réponse anti-apoptotique de la 14-3-3, réponse qui diffère en cas de stress fort (Owen et coll. 2012).

Fu et coll. (2013) ont mis en évidence chez l'éponge marine *Hymeniacidon perleue*, une sous-expression de transcrits 14-3-3 lors d'expositions à des cyanobactéries. Les auteurs soulignent que cette sous-expression a diminué la capacité de la 14-3-3 à bloquer l'activation de la voie MAPK induisant une réponse inflammatoire (p38 et JNK).

Chez les bivalves, Xue et coll. (2021) ont étudié la réponse de *Haliotis discus hannai* à une exposition à *Vibrio harveyi*. Chez cette espèce, l'expression constitutionnelle du gène de la 14-3-3

epsilon semble plus élevée que celle du gène de la 14-3-3 zeta. De plus, après une exposition de 12 à 72h à *Vibrio harveyi*, les deux types de 14-3-3 sont surexprimées mais l'expression chute à 96h. Wei et coll. (2015) ont étudié la réponse de *Crassostrea gigas* à un environnement acide dans les branchies (passage d'un pH contrôle de 8.19 à 7.5 pendant 28 jours). Ils ont identifié une modification d'expression d'une 14-3-3 zeta et d'une 14-3-3 epsilon. L'expression de la 14-3-3 zeta a été diminuée alors que celle de la 14-3-3 epsilon a été augmentée.

Riva, Cristoni, et Binelli (2012) ont mis en évidence une surexpression d'une protéine 14-3-3 chez *D. polymorpha* (branchies) lors d'une exposition au triclosan (580 ng/L, 7 jours). Les auteurs mettent en avant la fonction cytoprotectrice anti-apoptotique et la capacité de séquestration de contaminants pour expliquer cette surexpression. Cette conclusion rejoint celle d'Owen et coll. (2012) postulant que les protéines 14-3-3 sont sollicitées lors de stress modérés avec un rôle anti-apoptotique. Chez la moule bleue, Campos et coll. (2016), au cours d'expériences d'exposition de 4 semaines à une hypo-osmolarité et/ou à du propranolol (1 g/L), ont observé dans les branchies une diminution systématique d'abondance des protéines 14-3-3 que ce soit en conditions d'hypo-salinité seule ou avec le propranolol.

En conclusion, les 14-3-3 protéines sont des candidats dont le potentiel biomarqueur devra être testé en surveillance environnementale. En tant que marqueurs d'un protéome de stress, leurs modifications d'abondance peuvent être associées à des ruptures d'homéostasie cellulaire. Cette proposition rejoint une connaissance plus générale sur ces acteurs protéiques puisque les 14-3-3 protéines sont considérées comme une classe majeure de chaperonnes moléculaires, avec plus de 200 protéines ligands potentiels dont des facteurs de transcription et qu'elles ont été proposées comme marqueur en protéomique clinique (Pennington et coll. 2018).

II.6. Les DAP Major Vault Protéines

II.6.1. Présentation de la MVP

La Major Vault Protéine (MVP) est une protéine d'environ 100 kDa, composant principal de complexes ribonucléoprotéiques eucaryotes hautement conservés au cours de l'évolution et appelés particules de Vault (nom anglais retenu ici qui fait écho à la présence de structures en voûte dans la particule). En forme de cage de 420 Å de diamètre, 670 Å de long avec une masse moléculaire d'une dizaine de MDa, les particules de Vault ont été retrouvées chez des espèces aussi diverses que les champignons, les échinodermes et les mammifères, indiquant des fonctions cellulaires essentielles, en particulier chez les organismes multicellulaires (Kozlov et coll. 2006). Elles sont composées de petits

ARN structuraux (16 molécules identiques d'ARN par particules) et de plusieurs copies de trois protéines différentes : la MVP, la vPARP (poly ADP-ribose polymérase des *Vault*) et la TEP (protéine associée à la télomérase de 240 kDa) (Kozlov et coll. 2006). La vPARP est une protéine de 193 kDa avec un domaine catalytique PARP, polyADP-ribose polymérase, auquel elle doit son nom. *In vitro*, elle est capable de catalyser, de façon indépendante de l'ADN, sa propre polyADP-ribosylation ainsi que celle de la MVP.

La MVP est la protéine majoritaire des particules de Vault (environ une centaine de MVP par particule) et forme par auto-association la paroi de la particule. La MVP représente environ 70% de la masse totale en protéines des particules. L'agencement des MVP détermine la forme symétrique des particules de Vault. Ces particules comprennent une partie centrale en tonneau, deux épaulements de part et d'autre prolongés d'extrémités en coiffe avec un anneau central (figure 29).

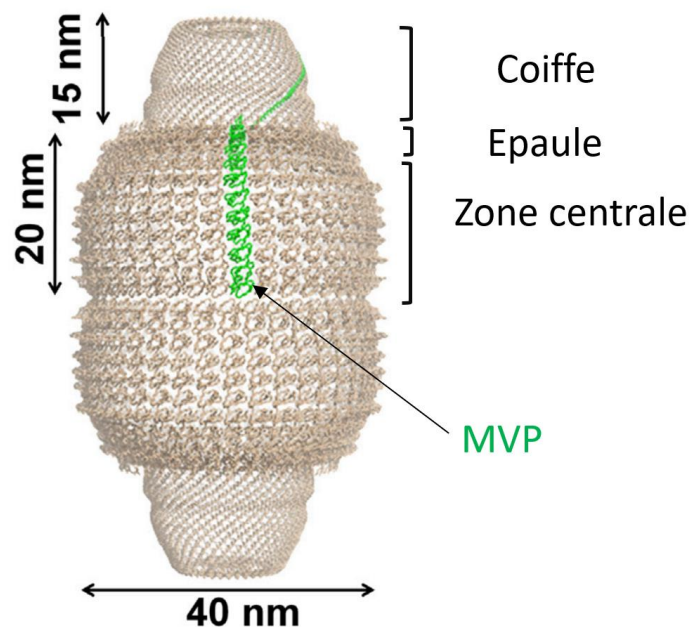


Figure 29 : Représentation schématique d'une particule Vault d'après Llauro et coll. (2014).

La localisation des particules de Vault dans les cellules de mammifères est principalement cytoplasmique, cependant, une partie est nucléaire et des formes extra-cellulaires sont décrites. Stewart et coll. (2005a) mettent en évidence une relocalisation de la MVP depuis le cytoplasme vers le noyau pendant l'embryogénèse chez l'oursin. Les fonctions des particules de Vault ne sont pas complètement élucidées ; il a été suggéré que ces structures seraient impliquées dans le trafic entre noyau et cytoplasme, l'immunité, la résistance aux médicaments des cellules cancéreuses (un autre nom de la MVP est LRP pour Lung Resistance-related Protein), la susceptibilité à la mort cellulaire ainsi qu'un rôle en tant que plate-forme de signalisation (Steiner et coll. 2006 ; Berger et coll. 2008).

II.6.2. Mise en évidence dans le jeu de données

Quinze DAP ont été identifiées comme des MVP sur l'ensemble des études (tableau 12). Chez les moules bleues, plusieurs protéoformes de MVP apparaissent comme modifiées sous l'effet d'un traitement dans 5 des 6 études, respectivement CAN3YP (spot 7075 et 7076 augmentés), CAN3LH (spot 10861 augmenté mais de poids moléculaire inférieur à celui attendu), HAP7 (spots 244 et 246, tous deux augmentés), HAP14 (spot 638 diminué) et CB153 (spot 2065, 2066 et 2071 diminués). Chez les dreissènes, 6 protéoformes identifiées comme MVP ont été mises en évidence, 4 dans l'étude Cd7Bug (spots 100, 101, 151 et 198,) et 2 dans l'étude Cd7Pol (spots 177 et 434). Ces protéoformes voient leur abondance diminuer à l'exception des protéoformes 198 et 434 qui, de plus, affichent des poids moléculaires notablement inférieurs à ceux attendus, respectivement à 81 et 56 kDa.

Tableau 12 : Occurrences des DAP de la Major Vault Protéine

Major vault protéine (MVP)											
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7075	↑	97	5,45	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021364753.1	96471	5,70	42	38
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7076	↑	97	5,50	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021364753.1	96471	5,70	51	58
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10861	↑	62	5,68	<i>Mytilus edulis</i>	gi 5714749	31741	5,45	5	32
HAP 7	<i>M. e.</i>	244	↑	97	5,50	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021364753.1	96471	5,70	16	56
HAP 7	<i>M. e.</i>	246	↑	97	5,40	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021364753.1	96471	5,70	9	46
HAP 14	<i>M. e.</i>	638	↓	97	5,50	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021364753.1	96471	5,70	51	58
CB153	<i>M. e.</i>	2065	↓	97	5,65	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2185674.1	96774	5,43	5	4
CB153	<i>M. e.</i>	2066	↓	97	5,40	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2185674.1	96774	5,43	20	9
CB153	<i>M. e.</i>	2071	↓	97	5,50	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2185674.1	96774	5,43	2	8
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	100	↓	96	5,70	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021364753.1	96471	5,70	53	40
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	101	↓	96	5,60	<i>Pecten maximus</i>	XP_033747539.1	96901	5,63	55	30
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	151	↓	93	5,70	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021364753.1	96471	5,70	52	37
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	198	↑	81	5,40	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021364753.2	96679	5,70	29	8
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	170	↓	93	5,70	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021364753.1	96471	5,70	59	25
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	434	↑	56	6,00	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021364753.1	96471	5,70	11	6

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e.p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r.*, *bugensis*) ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs}. est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pl_{obs}. le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pl son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

Sur les images des gels d'électrophorèse bidimensionnelle, les spots correspondants à la MVP sont de poids moléculaires très proches, de l'ordre de 97 kDa et de pl variables, compris entre 4,5 et 5,6. L'ensemble forme une chaîne de spots caractéristique d'états de phosphorylation différents mais d'autres modifications, comme des polyADP-ribosylations et S-glutathionylation sont possibles. Par ailleurs, cinq protéoformes de poids moléculaires inférieurs à 95 kDa sont également détectés (spot 10861, 151, 170, 198 et 434) (figure 30).

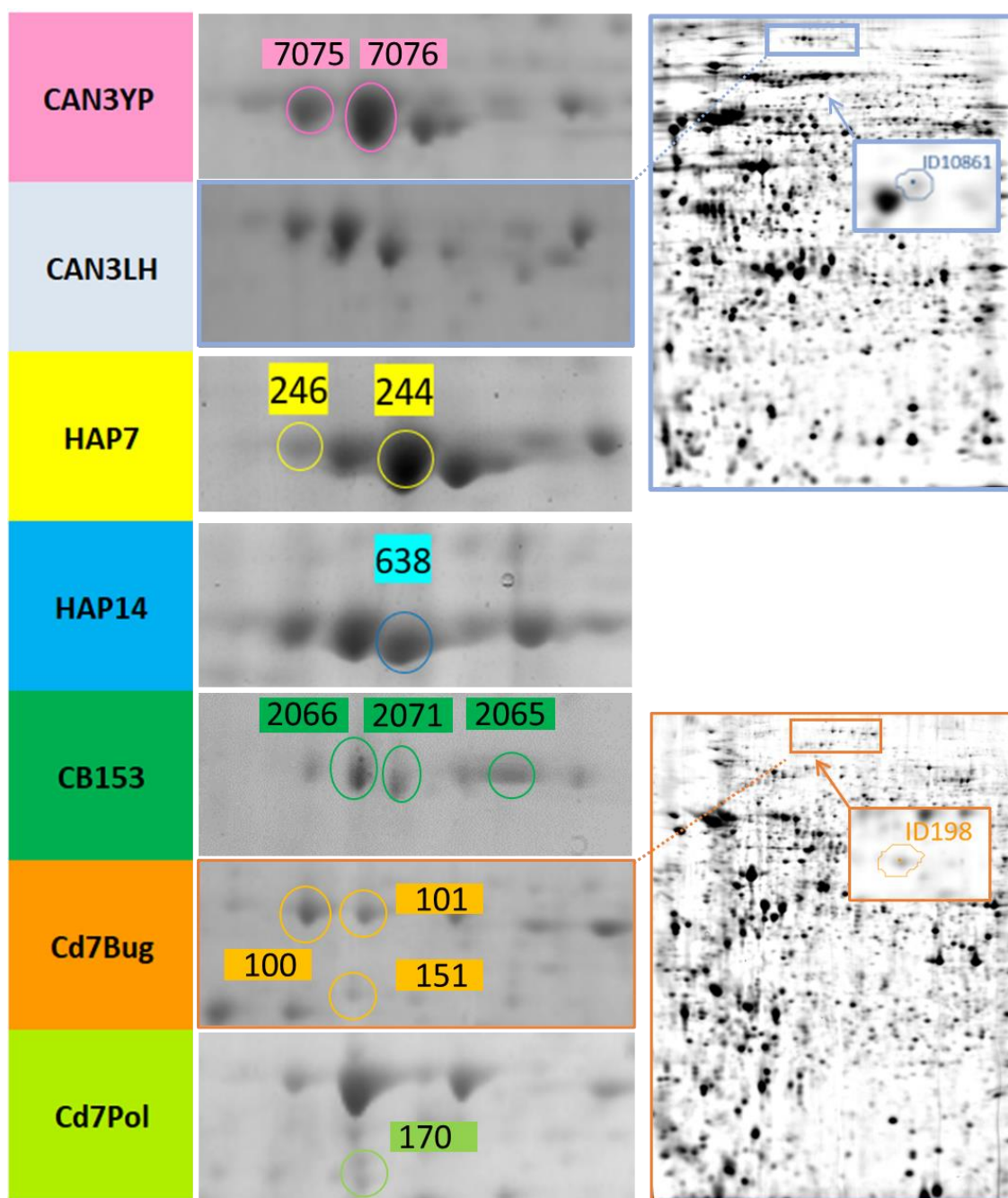


Figure 30 : Exemple de localisation des protéoformes MVP sur les gels de 2DE. En partie gauche, le code de chaque étude ; au centre, les DAP avec leur localisation sur le gel ; à droite, le positionnement de 2 MVP partielles

II.6.3. Comparaisons des séquences et structures des MVP

Une comparaison inter-espèce des séquences de MVP a été réalisée à partir des séquences peptidiques présentes dans nos banques locales pour les moules zébrées et quagga. Elles sont de même taille (863 résidus) et leurs caractéristiques physicochimiques sont proches (moule zébrée, PM 96 559 Da/ pI 5,70 et moule quagga, PM 97651 Da/ pI 5,64). Les séquences de moule zébrée (Dp) et de moule quagga (Db) ont été alignées sous Clustal Omega (figure 31). Les résidents différents surlignés

en gris indiquent un fort niveau d'identité. Au final, les deux MVP de dreissène sont identiques à plus de 95 %.

```

Db_MVP MSSTGKKDSESLFRIPPYFYIHVLDQNKNVTRLEIGPNTFIRQDNERVVVGPEQMITVPP 60
Dp_MVP MATTGKKDSESLIRIPPYFYIHVLDQNKNVTRLEIGPNTFIRQDNERVVVGPEQMITVPP 60
      *:.:*****:*****

Db_MVP RHYCVIENPTIRDKDNKVVLDDGNGQVRLHLDQEIQLAQDPFFLYPGEVLKQAVTPLKV 120
Dp_MVP RHYCVIENPTIRDKDNKVVLDDGNGQVRLHLDQEIQLAQDPFFLYPGEVLKQAVTPLKV 120
      *****

Db_MVP APNSALRLRSILDFEDETGEKRTAGDEWLFEGPATYIPRKEVVVEETVRATVIKPNQAIR 180
Dp_MVP APNSALRLRSILDFEDETGEKRTAGDEWLFEGPGTYIPRKEVVVEETVRATVIKPNQAIR 180
      *****

Db_MVP LRARKECIDREGINRVTGEEWLVKKTGAYLPGAYEEVVDVFNAYVLTEKKGLHMRSLRTF 240
Dp_MVP LRARKECIDRQGNRVTGEEWLVKKTGAYLPGAYEEVVDVFNAYVLTEKKGLHMRSLRTF 240
      *****:*****

Db_MVP KDDFGVVRKNGEEWLITMDMTETHIPNVYEEVVGVTNITSLSNRQYCVILDPVDEKGRPQ 300
Dp_MVP KDDFGVVRKNGEEWLITMDKTETHIPNVYEEVVGVTNITSLSNRQYCVILDPVDEKGRPQ 300
      *****

Db_MVP LGRKKLVKGELSFFLMPGEHLERGIQNVYVLGEDEGLILRANETFTDGEVTRRPGDRWMI 360
Dp_MVP MGRKKLVKGERSSFFLMPGEHLERGIQNVYVLGEDEGLILRANETFTDGDVTRRPGDRWMI 360
      :*****:*****:*****:*****:*****

Db_MVP RGPKEYVPPVEVEVVLKRQAIPLDENEGVYVRDIKTGRVRAVTGETYMINQDEELWAKEL 420
Dp_MVP RGPKEYVPPVEVEVVMKRQAIPLDENEGVYVRDIKTGRVRAVTGETYMINQDEELWAKEL 420
      *****:*****

Db_MVP PPAVEALLAAAKDPMADRRDRRTGPAEGAKPRDKTRVISFRVPHNAAVQIYDYKEKKARV 480
Dp_MVP PPAVEALLAAAKDPIADRGDRRTGPAEGSKPRDKTRVISFRVPHNAAVQIYDYKEKKARV 480
      *****:***:*****:*****

Db_MVP VFGPELVMLGPDEQFTQLSISGGKPKKPNAIKSLCLLLGPGFMRDIITVETSDHARLSLQ 540
Dp_MVP VFGPELVMLGPDEQFTQLSISGGKPKKPNEIKSLCLMLGPFMTDIITVETSDHARLSLQ 540
      *****:***:***

Db_MVP LSYNWHFEIKSKVNLEEAAMIFSVPDFVGDAKAIASRVRGAVAVQVPFDDFHKN SARVIR 600
Dp_MVP LSYNWHFEIQDKGKLDEAAMIFSVPDFVGDAKAIASRVRGAVAVQVPFDDFHKN SARVIR 600
      *****:.*:.*:*****

Db_MVP SSVFGLDEKGKVRDHFIKQNSLIITSIDIQSVEPVDQRTDRSLMKSQVQLAIEITNSQE 660
Dp_MVP SSVFGLDEKGKVRDHFMFKQNNLIITSIDIQSVEPVDQRTDRSLQSVQLAIEITNSQE 660
      *****:*****

Db_MVP ATARHEAERLEQEAKGRLERQKISDEAEAEKARRDLLELQALSSAVESTGQAKAEASRA 720
Dp_MVP ATARHEAERLEQEAKGRLERQKISDEAEAEKARRDLLELQANSAAVESTGQAKAEASRA 720
      *****:*****

Db_MVP EAARIEGEAAVEQAKLKSQAMKIEAESELSQLTNAREAEKFLKEQNEMELSKSRETADI 780
Dp_MVP EAARIEGEANVEQATLKSQAMKIEAESELSRLTSAREAEKFLKEQNELELSKSRETADI 780
      *****:*****:*****:*****

Db_MVP ETKKFKQMVDAIGASTLQAIATSGPDMQVRMLQALGMKSTVITDGKTPINLFNTAAGLIG 840
Dp_MVP ETKKFKQMVDAIGASTLQAIATSGPDMQVRMLQALGMKSTVITDGKTPINLFNTAAGLIG 840
      *****

```

```

Db_MVP GMGGAVVPSKRSRHADAEDAD 863
Dp_MVP GMGGAVVPSKRSRRDDEEVEGDD 863
*****: * * * . *

```

Figure 31 : Alignement sous ClustalOmega des séquences peptidiques MVP chez *D. r. bugensis* (Db) et *D. polymorpha* (Dp). **Légende** : "*", résidus conservés / ":", résidus partageant les mêmes propriétés physicochimiques / ".", résidus présentant une similarité) et renforcé par le surlignage en gris de tous les résidus non identiques, quel que soit leur niveau éventuel de similarité.

L'alignement de ces séquences avec le spot majoritaire de la MVP (NCBI, CAG2185674) de *Mytilus edulis* (Me), une protéine de 858 acides aminés, de PM 97774 Da et de pl de 5,43, révèle une protéine hautement conservée avec 72,4 % d'identité en moyenne entre dreissènes et moules marines (figure 32).

```

Db_MVP -----MSSTGKKD-----SESLFRIPPYFYIHVLDQNKNVTRLEIG 36
Dp_MVP -----MATTGKKD-----SESLIRIPPYFYIHVLDQNKNVTRLEIG 36
Me_MVP mvnhaytevkpetcensvnwtggnkvkkiqprqdnivihppsscphggdqgms-lsteyh 59
          :  **::.      .::.  **      *  **::.      *

Db_MVP PNTFIRQDNERVVVGPEQMITVPPRHVCVIENTPTIRDKDNKVLDGNGQVRLHLDQEI 96
Dp_MVP PNTFIRQDNERVVVGPEQMITVPPRHVCVIENTPTIRDKDNKVLDGNGQVRLHLDQEI 96
Me_MVP hitiyiqdnervvygpermitvpprhycienpvlkdkeckvfvdesggaklvhadqeir 119
          *:  *****  ***:*****:*****:***:***:  ***:  .*:***:*****

Db_MVP LAQDPFPLYPGEVLKQAVTPLKVVAPNSALRLRSILDFEDETGEKRTAGDEWLFEGPATY 156
Dp_MVP LAQDPFPLYPGEVLKQAVTPLKVVAPNSALRLRSILDFEDETGEKRTAGDEWLFEGPGTY 156
Me_MVP laqdpfplypgeilkqvvtplkvvaansalrlraildfeddeekrtagdewlfevgpty 179
          *****:***:*****  *****:*****:  *****:***

Db_MVP IPRKEVVVEETVRATVIKPNQAIRLRARKECIDREGINRVTGEEWLKKTGAYLPGAYEE 216
Dp_MVP IPRKEVVVEETVRATVIKPNQAIRLRARKECIDRQGNRVTGEEWLKKTGAYLPGAYEE 216
Me_MVP iprkevvi eetvratvirpnqairlarketidrqqvarvtgeewlvkktgaylpgayee 239
          *****:*****:*****  ***:*  *****:*****

Db_MVP VVDVFNAYVLTEKKGLHMRSLRTFKDDFGVVRKNGEEWLITMDMTETHIPNVYEEVVGVT 276
Dp_MVP VVDIVNAYVLTEKKGLHMRSLRTFKDDFGVVRKNGEEWLITMDKTETHIPNVYEEVVGVT 276
Me_MVP vdvvnayvltddkklhmrslrtfkddfgvtrkngewlikmtdtethipnvye evvgv 299
          ***:*****:*.*****:*****:*****:  *****:*****

Db_MVP NITSLSNRQYCVILDPVDEKGRPQLGRKKLVKGELSFFLLMPGEHLERGIQNVYVLGEDEG 336
Dp_MVP NITSLSNRQYCVILDPVDEKGRPQMGRKKLVKGERSSFFLLPGEQLERGIQNVYVLGEDEG 336
Me_MVP nittltsrqyciildpsdehgrpqlgrkklvkgecsffllpgerfergiqnvyvlgedeg 359
          ***:*.*****:***  ***:*****  *****:***:*****:*****

Db_MVP LILRANETFTDG-----EVTRRPGDRWMIRGPKEYVPPVEVEVVLKRQAIPLDENEGVY 390
Dp_MVP LILRANETFTDG-----DVTRRPGDRWMIRGPKEYVPPVEVEVVMKRQAIPLDENEGVY 390
Me_MVP vilratesfktdapdekdkverkpdkwmirgpaeyvppvevevimkrtaipldenegiy 419
          :****:*.***  :*  ***:*****  *****:***  *****:

Db_MVP VRDIKTGRVRAVTGETYMINQDEELWAKELPPAVEALLAAAKDPMADRRDRRTGPAEGAK 450
Dp_MVP VRDIKTGRVRAVTGETYMINQDEELWAKELPPAVEALLAAAKDPIADRGDRRTGPAEGSK 450
Me_MVP vrdiktgkvravtgetymlnqdeelwakelppavetllaqgkdpmadrsdrsk-ssds 478
          *****:*****:*****:***  .***:***.***  .:::

Db_MVP PRDKTRVISFRVPHNAAVQIYDYKEKKARVVFGPELVMLGPDEQFTQLSISGGKPKKPNA 510
Dp_MVP PRDKTRVISFRVPHNAAVQIYDYKEKKARVVFGPELVMLGPDEQFTQLSISGGKPKKPNE 510

```

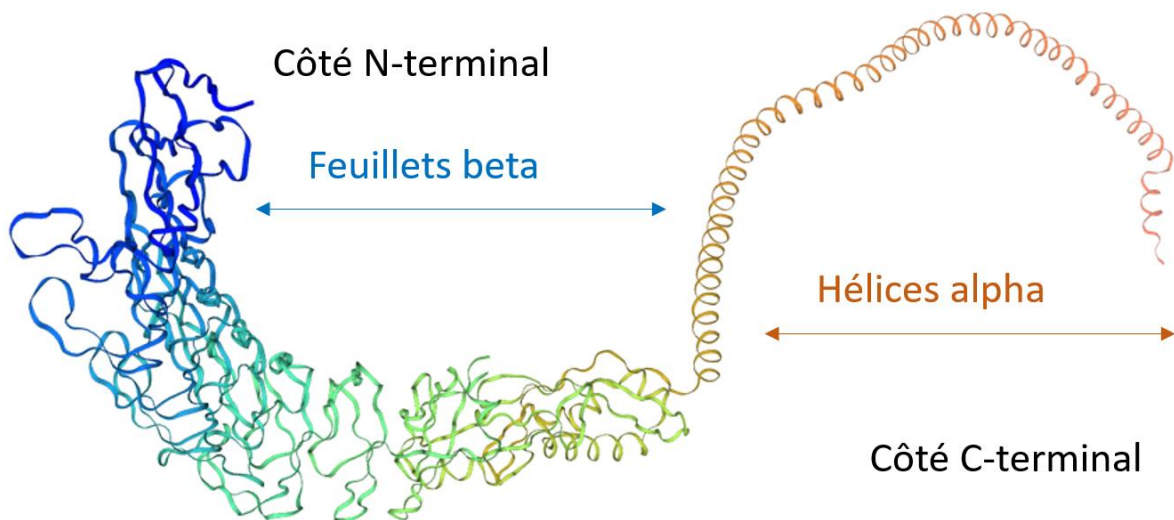



Figure 33 : Modélisation de la MVP de *Mytilus edulis* via Swissmodel (NCBI, CAG2185674 ; <https://swissmodel.expasy.org/>).

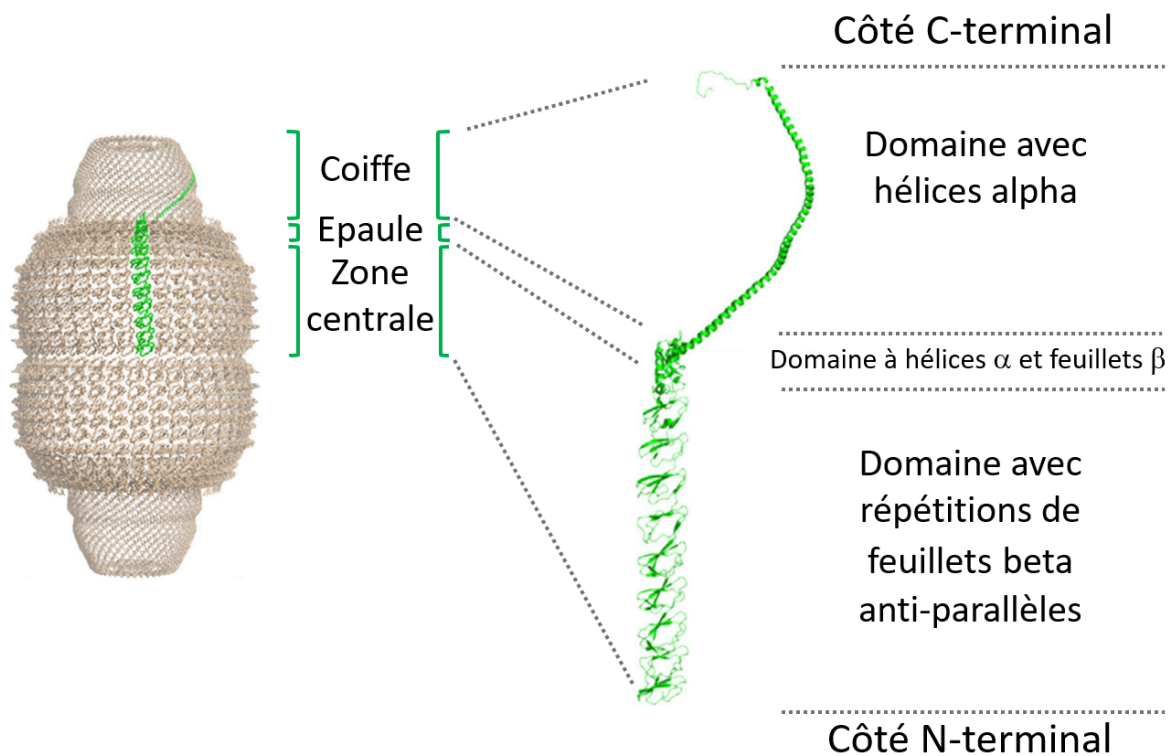


Figure 34 : Structure et organisation des MVP (en vert) dans une particule Vault d'après Llauro et coll. (2014).

La séquence primaire de la MVP se compose, côté C-terminal, de domaines répétés de feuillets β antiparallèles dont l'agencement forme la paroi en tonneau de la particule de Vault. Ce domaine est suivi d'une courte région centrale contenant un petit nombre d'hélices α et de feuillets β plissés (épaule). Le troisième domaine de la MVP est une coiffe formée en grande partie d'une association d'hélices α enroulées (partie coiled-coil), probablement impliquée dans l'oligomérisation des MVP. Enfin, l'extrémité de la coiffe en partie C-terminale, forme un anneau central (Kozlov et coll. 2006).

L'analyse FFPred PREDICTION réalisée sur la séquence de *Mytilus edulis* en utilisant l'application psipred confirme cette organisation typique (figure 35).

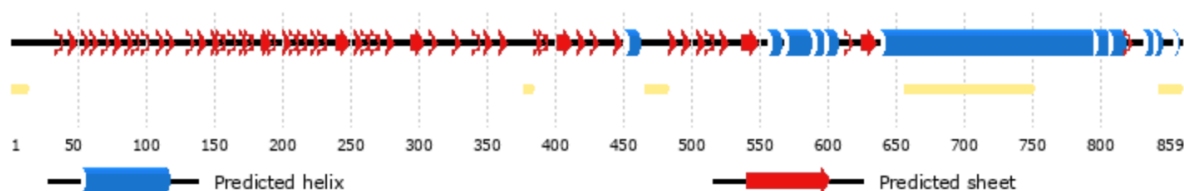


Figure 35 : Analyse des structures secondaires de la MVP de *Mytilus edulis* par FFPred PREDICTION (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>).

L'analyse Prosite dans la séquence MVP de *Mytilus edulis* révèle 7 motifs MVP-repeats localisés sur les 500 premiers acides aminés (figure 36).

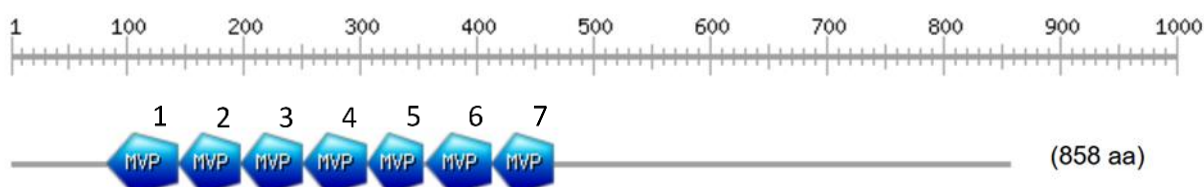


Figure 36 : Mise en évidence des motifs MVP-repeats chez *Mytilus edulis* (<https://prosite.expasy.org>).

Les séquences des 7 motifs ainsi détectés sont précisées ci-dessous, de la partie N-terminale à la partie C-terminale :

MVP1

RHYCIIENPVLKDKECKVVFDESGQAKLVHADQEIRLAQDPFPLYPGEILKQVVTPCLKVVA

MVP2

ANSALRLRAILDFEDDDEEKRTAGDEWLFEGPGTYIPRKEVVIEETVRATVIR

MVP3

PNQAIRLRARKETIDRQGVARVTGEEWLVKKTGAYLPGAYEEVVDVNVAYVLT

MVP4

DKKALHMRSLRTFKDDFGVTRKNGEELIKMTDTETHIPNVYEEVVGVDNITTLT

MVP5

RQYCIILDPSDEHGRPQLGRKKLVKGECSFFLLPGERFERGIQNVYVLG

MVP6

EDEGVILRATESFKDTPADEKDVERKPGDKWMIRGPAEYVPPVEVEVIMKRTAIPLD

MVP7

ENEGIIYVRDIKTGKVRAVTGETYMLNQDEELWAKELPPAVETLLAQGKDPMD

La figure suivante montre le recouvrement de ces domaines par les protéoformes identifiées comme MVP (figure 37).

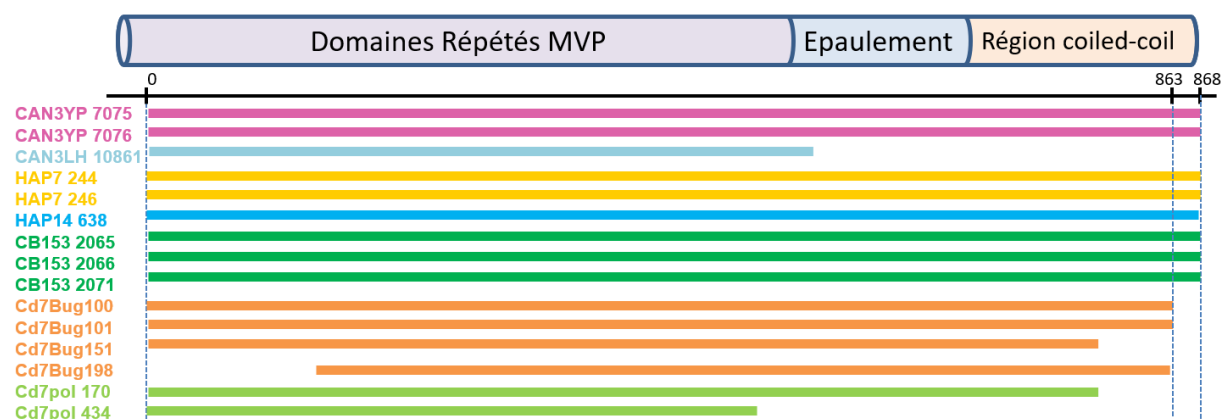


Figure 37 : Schématisation des zones de recouvrement de la MVP pour les protéoformes identifiées dans les différentes études. Chaque protéoforme est désignée par le code de l'étude dont elle est issue associé à son numéro de spot.

Dans les études concernant la moule bleue, les protéoformes identifiées correspondent majoritairement à la forme entière de la MVP (spot 7075 et 7076 dans CAN3YP, spots 244 et 246 dans HAP7, spot 638 dans HAP14, spots 2065, 2066 et 2071 dans CB153) à l'exception du spot 10861 de l'étude CAN3LH, auquel il manque la partie C-terminale de la protéine et qui correspond de ce fait à une forme tronquée de la MVP (figure 37). La recherche de sites potentiels de clivage a été faite mais n'a pas donné de site probant de troncature.

Chez les dreissènes, seules deux protéoformes (spots 100 et 101) correspondent à la forme entière de la MVP comme le montrent les recouvrements des spectres de masse surlignés en jaune (figure 38).

A - Spot 100 Quagga

>Db_MVP (PM96559/pI 5,70)

```
MSSTGKKDSESLFRIPPYFYIHVLDQNKNVTRLEIGPNTFIRQDNERVVVGPEQMITVPPRHYCVIENPTIRDKD
NKVVLDGNGQVRLHLDQEIQLAQDPFPLYPGEVLKQAVTPLKVVPAPNSALRLRSILDFEDETGEKRTAGDEWLF
EGPATYIPRKEVVVEETVRATVIKPNQAIRLRARKECIDREGINRVTGEEWLVKKTGAYLPGAYEEVVDVNNAYV
LTEKKGHLHMRSLRTFKDDFGVVRKNGEEWLITMDMTETHIPNVYEEVVGVTNITSLSNRQYCVILDPVDEKGRPQ
LGRKKLVKGELSFFLMPGEHLERGIQNVYVLGEDEGLILRANETFTDGEVTRRPGDRWMIRGPKIYVPPVEVEVV
LKRQAIPLDENEGVYVRDIKTGRVRAVTGETYMINQDEELWAKELPPAVEALLAAAKDPMADRDDRRTGPAEGAK
PRDKTRVISFRVPHNAAVQIYDYKEKKARVVFGEPLVMLGPDEQFTQLSISGGKPKKPNAIKSLCLLLGPGFMRD
IITVETSDHARLSLQLSYNWHFEIKSKVNLEEAAMIFSVPDFVGDACKAIASRVRGAVAQVPFDDFHKN SARVIR
SSVFGLDGKGVVDHFIQKQNSLIITSIDIQSVEPVDQRTDRLSLMKSVQLAIEITTSQEATARHEAERLEQEAQ
GRLERQKISDEAEAEKARRDLLELQALSSAVESTGQAKAEASRAEAARIEGEAAVEQAKLKSQAMKIEAESELS
QLTNAREAEKFLKEQNEMELSKSRETADIETKFKQMVDAIGASTLQAIATSGPDMQVRMLQALGMKSTVITDG
KTPINLFNTAAGLIGMGGA VVPSKRSRHADAEDAD
```

B - Spot 101 Quagga

>Db_MVP (PM96559/pI 5,70)

```
MSSTGKKDSESLFRIPPYFYIHVLDQNKNVTRLEIGPNTFIRQDNERVVVGPEQMITVPPRHYCVIENPTIRDKD
NKVVLDGNGQVRLHLDQEIQLAQDPFPLYPGEVLKQAVTPLKVVPAPNSALRLRSILDFEDETGEKRTAGDEWLF
EGPATYIPRKEVVVEETVRATVIKPNQAIRLRARKECIDREGINRVTGEEWLVKKTGAYLPGAYEEVVDVNNAYV
LTEKKGHLHMRSLRTFKDDFGVVRKNGEEWLITMDMTETHIPNVYEEVVGVTNITSLSNRQYCVILDPVDEKGRPQ
LGRKKLVKGELSFFLMPGEHLERGIQNVYVLGEDEGLILRANETFTDGEVTRRPGDRWMIRGPKIYVPPVEVEVV
```

LKRQAIPLDENEGVYVRDIKTGRVR~~AVTGETYMINQDEELWAKELPPAVEALLAAAKD~~PMADRDDRRTGPAEGAK
 PRDKTRVISFRVPHNAAVQIYDYKEKKARVVFGEPELVMLGPDEQFTQLSISGGKPKKPNAIKSLCLLLGPGFMRD
 IITVETSDHARLSLQLSYNWHFEIKSKVNLEEAAMIFSVPDFVGDACKAIASRVRGAVAQVPFDDFHKNSARVIR
 SSVFGLDEKGVKVRDHFIFKQNSLIITSIDIQSVEPVDQRTDRLMKSVQLAIEITTNSQEATARHEAERLEQEAK
 GRLERQKISDEAAEAKEARRDLLELQALSSAVESTGQAKAEAQSRAEAARIEGEAAVEQAKLKSQAMKIEAESELS
 QLTNAREAEELKFLKEQNELELSKSRETADIETKKFKQMVDAIGASTLQAIATSGPDMQVRMLQALGMKSTVITDG
 KTPINLFNTAAGLIGGMGGAVVPSKRSRHADAEDAD

Figure 38 : DAP correspondant aux protéoformes entières de MVP chez *D. r. bugensis*. A - Spot 100. B- Spot 101. Les peptides reconnus sont surlignés en jaune.

Toujours chez les dreissènes, les spots 151 et 170 correspondent à des formes légèrement plus courtes de la MVP. L'activité d'une métallopeptidase, compatible avec la condition d'exposition au cadmium, pourrait rendre compte de ces formes plus courtes. Les clivages enzymatiques répertoriés dans le site MEROPS indiquent un site de coupure possible entre la Glycine 847 et la leucine 848 de la MVP. Ces acides aminés sont notés sur les séquences en rouge (figure 39). Après clivages les protéoformes seraient théoriquement de PM 94043 et pI 5,83 pour le spot 151 et de PM 94050 et pI 5,83 pour le spot 170, ce qui est proche des valeurs observées.

A- Spot 151 Quagga

>Db_MVP (PM96559/pI 5,70)

MSSTGKKDSESLFRIPPYFYIHVLDQNKNVTRLEIGPNTFTTRQDHERVVVGPDKMITVPPRH~~HYCVIENPTIR~~DKD
 NKVVLDGNGQVRLHLDQEIIRLAQDPFPLYPGEVFKQAVTPLKVVAPDTALRLRAILD~~FEDETGEKRTAGDEWLF~~
 EGPATYIPRKEVVVEETVRATVIKPNQAIRLARKECIDREGKNRVTGEEWLKKTGAYLPGAYEEVVDVFNAYV
 LTEKKGLHMRSLRTFKDDFGVVRKNGEEWLITMDMTETHIPNVYEEVVGVTNITSLSNRQYCVILDPVDEKGRPQ
 MGRKKLVKGELSFFLMPGEHLERGIQNVYILGEDEGLILRANETFTDGDVTRRPGDRWMIRGPK~~EYVPPVEVEVV~~
 LKRQAIPLDDNEGVIYVRDVKTGRVR~~AVTGETYMINQDEELWAKELPPAVEALLAAAKDPIADR~~SDRRRTGPAEGAK
 PRDKTRVISFRVPHNAAVQIYDYKEKKARVVFGEPELVMLGPDEQFTQLSISGGKPKKPNEIKALCLMLGPDFMTD
 IITVETSDHARLSLQLSYNWHFAIKNRGNIEEATMIFSVPDFVGDACKAIASRVRGAVAQVPFDDFHKNSARVIR
 SSVFGFDEKDKVRDCFIKQNNLIITSIDIQSVEPVDQRTDRLQKSVQLAIEITTNSQEATARHEAERLEQEAK
 GRLERQKISDEAAEAKEARRDLLELQALSSAVESTGQAKAEAQSRAEAARIEGEAAVEQAKLKSQAMKIEAESELS
 RLTSAREAEELKFLKEQNELELSKSRETADIETKKFKQMVDAIGASTLQAIATSGPDMQVRMLQALGMKSTVITDG
 KTPINLFNTAAGLIGGMGGAVVPSKRSRHADAEDAD

B- Spot 170 Moule zébrée

>Dp_MVP (PM96777/pI 5,67)

MATTGKKESESLIRIPPYYIYIHVLDQNKNVTRLEIGPNTFIRQDHERVVVGPDKMITVPPRNYCVIENPIIRDKD
 NKVVLDGNGQVRLHLDQEIIRLAQDPFPLYPGEVLKQAVTPLKVVAPNTALRLRSILD~~FEDETGEKRTAGDEWLF~~
 EGPATYIPRKEVVVEETVRATVIKPNQAIRLARKECIDREGSNRVTGEEWLKRTGAYLPGAYEEVVDVFNAYV
 LTEKKGLHMRSLRTFKDDFGVVRKNGEEWLITMDMTETHIPNVYEEVVGVTNITSLSNRQYCVILDPVDEKGRPQ
 MGRKKLVKGRSFFLLPGEHLERGIQNVYILGEDEGLILRANETFTDGDVTRRPGDRWMIRGPK~~EYVPPVEVEVV~~
 MKRQAIPLDENEGVIYVRDIKSGRVRAVTGETYMINQDEELWAKELPPAVEALLAEAKDPMADRGDRRTGPAEGSK
 PRDKTRVISFRVPHNAAVQIYDYKEKKARVVFGEPELVMLGPDEQFTQLSISGGKPKKPNEIKSLCLLLGPDFMTD
 IITVETSDHARLSLKL SYNWHFAVQDKGLDEAAMIFSVPDFVGDACKAIASRVRGAVAQVPFDDFHKNSARVIR
 SSVFGLDEKGVKVRDHFMFQNNLIITSIDIQSVEPVDQRTDRLQKSVQLAIEITTNSQEATARHEAERLEQEAK
 GRLERQKISDEAAEAKEARRDLLELQALSSAVESTGQAKAEAQSRAEAARIEGEAAVEQAKLKSQAMKIEAESELS
 QLTNAREAEELKFLKEQNELELSKSRETADIETKKFKQMVDAIGASTLQAIATSGPDMQVRMLQALGMKSTVITDG
 KTPINLFNTAAGLIGGMGGAVVPSKRSRRDDEEVEGDD

Figure 39 : DAP correspondant à des MVP de poids moléculaire légèrement inférieur à la forme entière chez : A- *D. r. bugensis*, spot 151 et, B- *D. polymorpha*, spot 101. Les peptides reconnus sont surlignés en jaune. Les sites de clivages détectés via MEROPS sont indiqués en rouge.

Deux formes plus fragmentaires sont également retrouvées, toutes deux plus abondantes en condition de stress, une dans l'étude Cd7Bug (spot 198) et l'autre dans l'étude Cd7Pol (spot 434). Les recouvrements des spectres de masse montrent qu'il manque la première partie de la séquence à la protéoforme 198 et, inversement, la fin de la séquence à la protéoforme 434 (figure 40).

A - Spot 198 Quagga

>Db_MVP (PM96559/pI 5,70)

MSSTGKKDSESLFRIPPYFYIHVLDQNKNVTRLEIGPNTFTTRQDHERVVVGPDKMITVPPRHYCVIENPTIRDKD
NKVVLDGNGQVRLHLDQEIQLAQDPFLYPGEVFKQAVTPLKVVAPDTALRLRAILDFEDETEGEKRTAGDEWLF
EGPATYIPRKEVVVEETVRATVIKPNQAIRLRARKECIDREGKNRVTGEEWLKKTGAYLPGAYEEVVDVNAYV
LTEKKGLHMRSLRTFKDDFGVVRKNGEELITMDMTETHIPNVYEEVVGVTNITSLSNRQYCVILDPVDEKGRPQ
MGRKKLVKGELSFFLMPGEHLERGIQNVYILGEDEGLILRANETFTDGDVTRRPGDRWMIRGPKEYVPPVEVEVV
LKRQAIPLDDNEGVIYVRDVKTRVRAVTGETYMINQDEELWAKEELPPAVEALLAAAKDPIADRSDRRTGPAEGAK
PRDKTRVISFRVPHNAAVQIYDYKEKKARVVFGEPLVMLGPDQFTQLSISGGKPKKPNEIKALCLMLGPDFMTD
IITVETSDHARLSLQLSYNWHFAIKNRGNIEEATMIFSVPDFVGACKAIASRVRGAVAQVPFDDFHKNSARVIR
SSVFGFDEKDKVRDCFIFKQNNLIITSIDIQSVEPVDQRTDRLQKSVQLAIEITTNQSQEATARHEAERLEQEAK
GRLERQKISDEAAAEKARRDLLELQALSSAVESTGQAKAEASRAEAARIEGEAAVEQAKLKSQAMKIEAESELS
RLTSAREAEKFLKEQNELELSKSRETADIETKKFKQMVDAIGASTLQAIATSGPDMQVRMLQALGMKSTVITDG
KTPINLFNTAAGLIGMGGAUVPSKRSRHADAEDAD

B- Spot 434 Moule zébrée

>Dp_MVP (PM96777/pI 5,67)

MATTGKKSESLIRIPPYYYIHVLDQNKNVTRLEIGPNTFIRQDHERVVVGPDKMITVPPRNYCVIENPIIRDKD
NKVVLDGNGQVRLHLDQEIQLAQDPFLYPGEVLKQAVTPLKVVAPNTALRLSILDFEDETEGEKRTAGDEWLF
EGPATYIPRKEVVVEETVRATVIKPNQAIRLRARKECIDREGSNRVGTGEEWLKKTGAYLPGAYEEVVDVNAYV
LTEKKGLHMRSLRTFKDDFGVVRKNGEELITMDMTETHIPNVYEEVVGVSNTITSLSNRQYCVILDPVDEKGRPQ
MGRKKLVKGELSFFLMPGEQLERGIQNVYILGEDEGLILRANETFTDGDVTRRPGDRWMIRGPKEYVPPVEVEVV
MKRQAIPLDENEGVIYVRDIKTGRVRAVTGETYMINQDEELWAKEELPPAVEALLAAAKDPIADRGRRTGPAEGSK
PRDKTRVISFRVPHNAAVQIYDYKEKKARVVFGEPLVMLGPDQFTQLSISGGKPKKPNEIKSLCLMLGPDFMTD
IITVETSDHARLSLKLSSYNWHFAVKNRDNIDEAAMIFSVPDFVGACKAIASRVRGAVAQVPFDDFHKNSARVIR
SSVFGFDEKDKVRDHFMFQNNLIITSIDIQSVEPVDQRTDRLQKSVQLAIEITTNQSQEATARHEAERLEQEAK
GRLERQKISDEAAAEKARRDLLELQANSAVESTGQAKAEASRAEAARIEGEANVEQATLKSQAMKIEAESELS
QLTNAREAEKFLKEQNELELSKSRETADIETKKFKQMVDAIGASTLQAIATSGPDMQVRMLQALGMKSTVITDG
KTPINLFNTAAGLIGMGGAUVPSKRSRREVVEEGDD

Figure 40 : Formes fragmentaires de MVP retrouvées chez : **A-** *D. r. bugensis* et, **B-** *D. polymorpha*. Les peptides reconnus sont surlignés en jaune.

Les zones de recouvrement ne permettent pas de conclure quant aux protéases qui pourraient être impliquées dans la formation de ces deux formes fragmentaires. Il est cependant intéressant de souligner que ces formes apparaissent parallèlement à une diminution d'abondance des formes entières, suggérant une dégradation accélérée de la MVP dans les conditions d'exposition testées.

II.6.4 Confrontation avec la littérature MVP comme acteur dans la réponse au stress

Les fonctions des particules de Vault ne sont pas toutes clairement établies. Elles interviennent dans le trafic cellulaire entre noyau, cytoplasme et membrane cellulaire. Elles sont impliquées dans la signalisation cellulaire et elles ont été associées à des formes de chimiorésistances de cellules

cancéreuses (MVP alias LRP, Lung Resistance-related Protein) et dans des mécanismes de cytoprotection. De ce fait, une induction de MVP peut être observée en réponse au stress cellulaire. Inversement, Grossi et coll. 2020 ont démontré qu'en régulant à la baisse l'expression de la MVP, la voie de l'apoptose est favorisée. Par ailleurs, des modifications post-traductionnelles pour cette protéine sont décrites dans la littérature.

Das et ses collègues (2016) ont mis en évidence, sur des cellules bronchiales humaines, des S-glutathionylations de la MVP sous l'effet d'un stress oxydant et montré que cette modification chimique favorise la liaison de la MVP à une myosine, ce qui empêche la transduction d'un signal de mort cellulaire passant par cette myosine.

Lors de la caractérisation de la MVP de l'oursin, (Stewart et coll. 2005a) ont remarqué sur des Western Blot un fragment de l'ordre de 50 kDa sur lequel se fixent les anticorps dirigés contre la MVP. Les auteurs ont conclu à une dégradation protéique de la MVP.

Grossi et coll (2020) ont également observé des clivages réguliers de la protéine MVP *in vitro* sur des lignées cellulaires en conditions apoptotiques. Les auteurs ont démontré que ces clivages étaient assurés par des caspases et participaient au basculement dans la voie apoptotique. Enfin, ils ont mis en évidence que des MVP rendues résistantes au clivage inhibaient l'apoptose. Ces travaux confirment un rôle anti-apoptotique de la MVP sous sa forme entière et donc son implication dans la cytoprotection (Grossi et coll. 2020).

Ces résultats suggèrent que les augmentations des spots majeurs de la MVP observées dans nos études indiquent un effet protecteur exercé par la MVP, et qu'au contraire, la présence de formes partielles de la MVP serait le signe de l'induction de la voie de l'apoptose. L'analyse des spectres de masse des MVP de PM inférieurs à ceux attendus suggèrent la présence de fragments MVP de façon cohérente avec ces données. Ils pourraient s'agir de modifications post-traductionnelles de type troncature réalisées dans un contexte pro-apoptotique.

III. Les DAP intervenant dans les processus de détoxification et le système antioxydant

Dans cette catégorie, apparaissent des protéines classiquement impliquées dans la détoxification cellulaire et le maintien de l'équilibre redox. De fait, l'exposition des organismes à des contaminants provoque l'induction de systèmes de détoxification avec la participation des enzymes de biotransformation, parmi lesquelles les aldéhydes déshydrogénases. En outre, de nombreux stress affectent directement ou indirectement l'homéostasie redox, conduisant à une activation des systèmes anti-oxydants. En accord avec cette remarque, 6 des 10 protéines identifiées dans cette catégorie appartiennent au même processus biologique, GO 0006979, réponse au stress oxydant (figure 41).

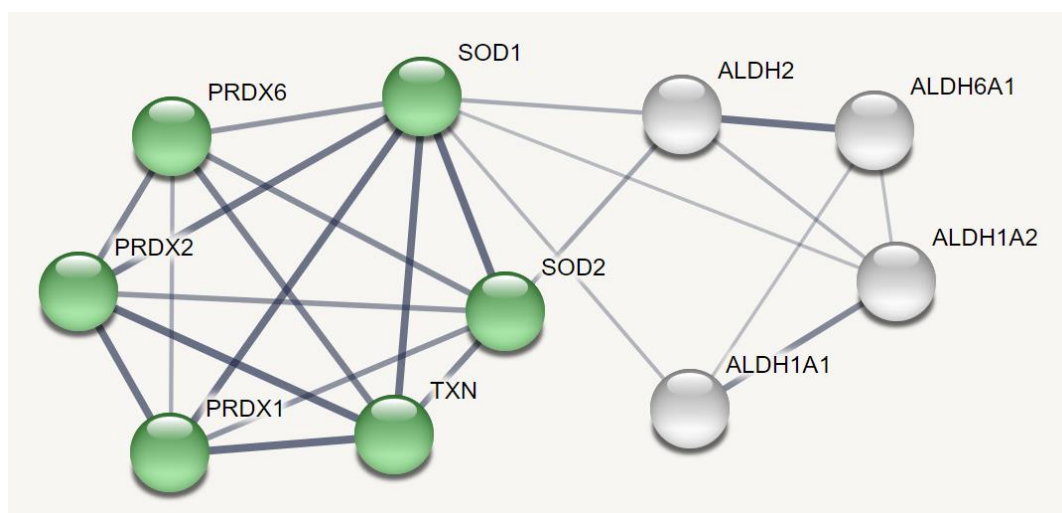


Figure 41 : String Interactions au sein de la catégorie DETOXICATION & SYSTEME ANTIOXYDANT. En vert, les protéines appartenant au même processus biologique : GO 0006979, Réponse au stress oxydant. L'épaisseur des traits représente le niveau de confiance des interactions détectées par String (<https://string-db.org/Interactions>).

III.1. Les DAP aldéhydes déshydrogénases

Les aldéhydes déshydrogénases sont une grande famille d'enzymes ayant un poids moléculaire de l'ordre de 50 kDa comprenant des formes cytosoliques et mitochondriales capables d'assurer l'oxydation irréversible de composés présentant des fonctions aldéhydes, et de là, de participer à la métabolisation des alcools (ALDH2). Certaines isoformes comme ALDH1A1 et ALDH1A2 interviennent dans le métabolisme de l'acide rétinoïque et par conséquent dans les voies de signalisation associées. L'isoforme ALDH6A1 est impliquée dans le catabolisme des pyrimidines et celui de la valine. L'analyse des résultats montre l'implication répétée de ces enzymes dans les différentes situations de stress testées (tableau 13). Cependant, d'une étude à l'autre, l'isoforme détectée n'est pas la même et les

sens de variation sont eux-mêmes très variables de sorte qu'en dépit d'un intérêt évident, cette catégorie n'a pas fait l'objet d'une étude plus poussée.

Tableau 13 : Occurrences des DAP aldéhydes déshydrogénases

les aldéhydes déshydrogénases												
Etude	Espèce	ID	GeneC.	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7364	ALDH1A1	↑	49	5,6	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2235757.1	52668	5,59	6	3
HAP 7	<i>M. e.</i>	595	ALDH1A1	↓	51	8,0	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI65089.1	55022	6,99	17	6
HAP 14	<i>M. e.</i>	1174	ALDH1A1	↓	45	8,5	<i>Placopecten magellanicus</i>	AAF73122.1	53670	7,83	8	6
CB153	<i>M. e.</i>	2371	ALDH1A1	↓	49	6,0	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2235757.1	52668	5,59	11	3
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	518	ALDH1A2	↓	49	6,1	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021365245.1	53958	6,05	29	6
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	644	ALDH1A2	↑	44	5,7	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	OWF48408.1	78367	9,63	60	26
CB153	<i>M. e.</i>	2261	ALDH2	↓	55	5,0	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2223863.1	57390	5,68	10	5
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	578	ALDH2	↑	46	6,3	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021346041.1	57385	8,47	28	11
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7314	ALDH6A1	↓	55	5,5	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2198878.1	56663	5,56	3	3
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10955	ALDH6A1	↓	53	5,5	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2198878.1	56663	5,56	3	2
HAP 7	<i>M. e.</i>	505	ALDH6A1	↓	59	5,5	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2198878.1	56663	5,56	38	26

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e. p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r.*, *bugensis*) ; GeneC sa référence GeneCards ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs} est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pl_{obs} le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pl son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

III.2. Les DAP thiorédoxines/peroxyrédoxines

Une implication répétée du système anti-oxydant thiorédoxine/peroxyrédoxine a, de la même manière, été observée (tableau 14).

Les thiorédoxines (TXN) sont des protéines hautement conservées, à activité oxydoréductase à large spécificité. Ce sont de petites protéines de l'ordre de 12kDa, impliquées dans la réduction de protéines-cibles par la formation de ponts disulfures. Elles interviennent comme cofacteurs dans de nombreuses réactions enzymatiques. Ainsi, en couplage avec les peroxyrédoxines, les thiorédoxines fournissent des électrons qui réduisent les peroxyrédoxines au cours de leur cycle catalytique. Inversement, dans une voie de transduction favorisant la signalisation via du peroxyde d'hydrogène, les peroxyrédoxines peuvent stimuler l'oxydation des thiorédoxines.

Avec un poids moléculaire autour de 25kDa, les peroxyrédoxines (PRDX) sont des peroxydases présentes en abondance dans les cellules. Elles utilisent des cystéines oxydées de manière réversible pour décomposer catalytiquement les peroxydes. Elles jouent ainsi un rôle antioxydant protecteur en piégeant les hydroperoxydes de groupements alkyles ou du peroxyde d'hydrogène. De ce fait, ces protéines participent au contrôle et au maintien du niveau intracellulaire des ROS. Outre cette activité

antioxydante, elles assurent des fonctions de protéines chaperonnes et sont considérées, de façon générale, comme cytoprotectrices (Brown et coll. 2013).

Tableau 14 : Occurrences des DAP thiorédoxines/peroxyrédoxines

les thiorédoxines/peroxyrédoxines												
Etude	Espèce	ID	GeneC.	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
STM21K	<i>M. e. p.</i>	2349	PRDX	↓	22	7,6	<i>Pinctada fucata</i>	AKV63195.1	22270	7,63	6	3
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7990	PRDX1	↑	20	6,5	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2199162.1	31044	5,76	30	12
CB153	<i>M. e.</i>	2959	PRDX1	↑	21	7,0	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2199162.1	31044	5,76	9	2
CB153	<i>M. e.</i>	3164	PRDX2	↓	14	4,4	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AFM43654.1	11667	4,47	33	4
HAP 7	<i>M. e.</i>	955	PRDX6	↑	23	6,6	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2227509.1	24368	6,43	39	20
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1028	PRDX6	↓	29	6,3	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011441532.1	27524	6,51	50	11
HAP 14	<i>M. e.</i>	1721	TXN	↓	10	4,2	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AFM43654.1	11667	4,47	33	4
HAP 14	<i>M. e.</i>	1859	TXN	↓	15	4,8	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AFM43654.1	11667	4,47	21	2
CB153	<i>M. e.</i>	2938	TXN	↓	22	6,9	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2227509.1	24368	6,43	29	7

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e. p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r.*, *bugensis*) ; GeneC sa référence GeneCards ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs} est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pl_{obs} le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pl son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

Chez les mammifères, sur la base du nombre de résidus Cys nécessaires à l'activité catalytique et du type de liaison disulfure formée, les peroxyrédoxines, qui sont au nombre de 6, ont été divisées en trois catégories: 2-Cys (Prx I – IV), 2-Cys atypique (Prx V), et 1-Cys (Prx VI) (Chae et coll. 1994). Les peroxyrédoxines 2-Cys typiques sont la plus grande classe, fonctionnant comme des homodimères obligatoires reliées par un pont disulfure intermoléculaire. Les 2-Cys atypiques sont strictement monomériques avec un pont disulfure intramoléculaire et les 1-Cys sont largement hétérodimériques. Cette classification a été étendue à toutes les peroxyrédoxines. A titre d'exemple, le génome de la drosophile comporte 6 gènes appartenant à la famille des peroxyrédoxines : dPrx1, dPrx3-5 et dPrx6a-b. Autre exemple, le génome de *C. elegans* compte 3 gènes appartenant à la famille des peroxyrédoxines : prdx-2, prdx-3 et prdx-6. Les prdx-2 et prdx-3 codent pour des peroxyrédoxines 2-Cys typiques, tandis que prdx-6 ressemble fortement à une peroxyrédoxine 1-Cys de mammifère.

En plus de maintenir l'équilibre des ROS, les thiorédoxines et les peroxyrédoxines participent également à diverses fonctions biologiques, ainsi elles interviennent dans l'apoptose cellulaire, la prolifération, la différenciation, la signalisation intracellulaire et la modulation de l'expression génique. Detienne et ses collaborateurs recensent de nombreuses études mettant en évidence les capacités des peroxyrédoxines à arrêter la progression du cycle cellulaire, ainsi que des fonctions chaperonnes pour les peroxyrédoxines à 2 Cys (Detienne et coll. 2018). *In vitro*, dans des cellules HeLa, cette fonction

chaperonne est retrouvée pour une peroxyrédoxine et une forme tronquée de la protéine a aussi été mise en évidence (Moon et coll. 2005). La fonction chaperonne des peroxyrédoxines est confirmée chez la levure dans des contextes où la protéine est hyper-oxydée (Jang et coll. 2004).

Chez les bivalves, les thiorédoxines et les peroxyrédoxines sont régulièrement identifiées dans des études omiques écotoxicologiques. C'est le cas, dans la réponse au stress thermique chez *Laternula elliptica* (H. Park et coll. 2008) ou dans les hémocytes de *Perna perna* exposés à du $ZnCl_2$ (Trevisan et coll. 2014) comme dans les hémocytes de moule zébrée lors d'infections microbiennes (Leprêtre et coll. 2020).

III.3. Les DAP superoxydes dismutases (SOD)

III.3.1. Présentation des SOD

Les SOD (EC 1.15.1.1) sont des métalloenzymes largement présentes chez les procaryotes et les eucaryotes. Elles sont classées selon les cofacteurs métalliques intégrés à leurs sites actifs : cuivre/zinc (Cu/Zn-SOD), manganèse (Mn-SOD), fer (Fe-SOD) ou nickel (Ni-SOD). Chez les eucaryotes, la Mn-SOD est localisée dans la matrice mitochondriale et il existe deux formes de Cu/Zn-SOD, l'une intracellulaire et la deuxième extra-cellulaire ; les Fe-SOD sont typiques des végétaux. La fonction majeure des superoxydes dismutases est de former à partir de l'anion superoxyde du peroxyde d'hydrogène. Un couplage avec une catalase assure l'élimination de ce dernier.

La Cu/Zn-SOD intracellulaire (SOD1) est la plus abondante et fait environ 30k Da. Elle possède une structure homo-dimérique extrêmement bien conservée chez les métazoaires (Perry et coll. 2010). Elle est présente majoritairement dans le cytosol et au niveau de la membrane externe mitochondriale mais une localisation nucléaire est également possible. La Mn-SOD (SOD2) se présente sous forme de dimères ou de tétramères, avec un seul atome de manganèse par sous-unité. Sa localisation est exclusivement mitochondriale chez les métazoaires.

III.3.2. Mise en évidence dans le jeu de données

Des variations d'abondance de SOD sont observées chez les deux genres, *Mytilus* et *Dreissena*, dans 5 des études (tableau 15). Elles concernent essentiellement la Cu/Zn-SOD qui fera l'objet d'une analyse plus approfondie. Pour les dreissènes, les protéoformes identifiées comme superoxyde dismutases correspondant à une forme Mn-SOD (spot1176) chez *Dreissena polymorpha* et Cu/Zn-SOD (spot 1303) chez *Dreissena bugensis rostriformis*. Dans les deux cas il s'agit d'une diminution d'abondance du DAP. Chez *Mytilus edulis*, les DAP concernent la Cu/Zn-SOD et apparaissent dans

l'étude CAN3LH (11815, diminution), dans l'étude CB153 (spots 3103, diminution) et enfin dans l'étude HAP14 (spot 1686, augmentation).

Chez les dreissènes, les séquences peptidiques des Cu/Zn-SOD cytosoliques présentent des niveaux d'identité et de similarité remarquables, respectivement 92,3% et 96, 7%. Les Cu/Zn-SOD conservent toutefois des caractéristiques propres à chaque espèce, ce qui en fait nous a amené à les proposer comme un outil supplémentaire de discrimination des deux espèces. Cette particularité a fait l'objet d'un travail connexe à ma thèse qui a été publié en 2020 (Cf. annexe 1, (Rocher et coll. 2020)).

Tableau 15 : Occurrences des DAP de superoxyde dismutase

les superoxydes dismutases												
Etude	Espèce	ID	GeneC.	Var.	PM _{obs}	pI _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pI	% cov.	pep.
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11815	SOD1	↓	19	6,0	<i>Mytilus edulis</i>	CAE46443.1	15885	5,84	31	8
HAP 14	<i>M. e.</i>	1686	SOD1	↑	14	6,2	<i>Mytilus edulis</i>	CAE46443.1	15885	5,84	31	4
CB153	<i>M. e.</i>	3103	SOD1	↓	16	6,3	<i>Mytilus edulis</i>	CAE46443.1	15885	5,84	24	3
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1303	SOD1	↓	21	5,9	<i>Dreissena polymorpha</i>	AAQ88164.1	15656	5,78	73	14
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	1176	SOD2	↓	25	8,5	<i>Ruditapes philippinarum</i>	AFO64928.1	25069	6,7	38	10

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e.p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r. bugensis*) ; GeneC sa référence GeneCards ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs}. est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pI_{obs}. le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pI son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

III.3.3. Comparaison des SOD entre les trois espèces étudiées

- **Cas de la Cu/Zn-SOD**

Une séquence partielle de la Cu/Zn-SOD de *Dreissena polymorpha* a été publiée et est répertoriée dans NCBI sous la référence AAQ88164.1 (Geret et coll. 2004). Elle correspond aux 130 premiers acides aminés de la protéine et s'aligne avec celle de la banque locale utilisée qui, avec 153 acides aminés, est complète.

L'alignement des séquences Cu/Zn-SOD (SOD1) de la moule zébrée (Dp) (PM 153538 Da/ pI 5,67) et de la moule quagga (Db) (PM 15655 Da/ pI 5,78) montre une forte identité de 93,5% entre les deux espèces de dreissènes (figure 42).

```

Dp_SOD1 MPINACCVLKG DG VVTGVINFTQEGPGAPVKLSGKITGLAEGQHGFHVHEFGDNSNGCVS 60
Db_SOD1 MPINACCVLRGDGVVTGVINFTQEA PGAPVKLTGKISGLAEGQHGFHVHEFGDNSNGCVS 60
          *****:*****.*****:***:*****

Dp_SOD1 AGPHFNPSGKTHGAPQDEERHAGDLGNVTATAETCDVNITDCKITLTGPESIIGRTMVIH 120
Db_SOD1 AGPHFNPHGKTHGAPDEERHAGDLGNVKATPETCDVNITDSKISLTGPESIIGRTMVIH 120
          *****:*****.*** *****.***:*****

Dp_SOD1 ADVDDLKGGGHELSKTTGNAGARLACGVIGIAK 153

```

```
Db_SOD1  ADVDDLKGKGHELSKTTGNAGARLACGVIGIAK 153
*****
```

Figure 42 : Alignement sous ClustalOmega des séquences peptidiques de SOD1 chez *D. polymorpha* (Dp) et *D. r. bugensis* (Db). *Légende :* "*", résidus conservés / ":", résidus partageant les mêmes propriétés physicochimiques / ".", résidus présentant une similarité.

L'alignement de ces séquences avec celle de la Cu/Zn-SOD de *Mytilus edulis* (CAE46443.1 ; PM 15885 Da / pl 5,84) indique 65,8 % d'identité entre dreissenés et moules marines (figure 43).

```
Dp_SOD1  --MPINACCVLKGDGVVTGVINFTQEGPGAPVKLSGKITGLAEGQHGFHVHEFGDNSNGC 58
Db_SOD1  --MPINACCVLRGDGVVTGVINFTQEAPGAPVKLTGKISGLAEGQHGFHVHEFGDNSNGC 58
Me_SOD1  maanikavcvlkgdgavtgtvafsqngdsavtvtgeltglapgehghfvhefgdntngc 60
          *: * ****:****.****.: *: *: .: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:
          *: * ****:****.****.: *: *: .: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:

Dp_SOD1  VSAGPHFNPSGKTHGAPQDEERHAGDLGNVTATAE-TCDVNITDCKITLTGPESIIGRTM 117
Db_SOD1  VSAGPHFNPHGKTHGAPQDEERHAGDLGNVKATPE-TCDVNITDSKISLTGPESIIGRTM 117
Me_SOD1  tsagshfnfpfgkthgapgdeerhvgdlnvlnadgkaeikitdtklsltgppqsiigrtv 120
          .*** **** ***** ***** ***** * . : ..:::*** *: *: *: *: *: *:
          *: * ****:****.****.: *: *: .: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:

Dp_SOD1  VIHADVDDLKGKG-GHELSKTTGNAGARLACGVIGIAK- 153
Db_SOD1  VIHADVDDLKGKG-GHELSKTTGNAGARLACGVIGIAK- 153
Me_SOD1  vvhadiddlgkggghelskttgntggrlacgvigiskv 158
          *: *: *: *: *: *: ***** *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:
          *: * ****:****.****.: *: *: .: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *
```

Figure 43 : Alignement sous ClustalOmega de la séquence peptidique de SOD1 chez *M. edulis* avec celles de *D. polymorpha* (Dp) et *D. r. bugensis* (Db). *Légende :* "*", résidus conservés / ":", résidus partageant les mêmes propriétés physicochimiques / ".", résidus présentant une similarité.

• Cas de la Mn-SOD

Pour la Mn-SOD (SOD2), l'alignement des séquences de la moule zébrée (Dp) (PM 23129 Da/ pl 7,82) et de la moule quagga (Db) (PM 20074 Da/ pl 8,95) montre une identité de 82% entre les deux espèces, une valeur relativement faible. L'hypothèse formulée est que la séquence utilisée pour la quagga est incomplète, il lui manquerait ces 26 premiers acides aminés (figure 44).

```
Db_SOD2  -----KDIMTIHHQKHHQTYINNLNATEEKLAAAVEKKN 34
Dp_SOD2  MLGTGRLKHTLPDLPYEYNALEPCISHDIMMIHHQKHHQTYINNLNATEEKLAAVEKKN 60
          : *** *****.*****

Db_SOD2  INEIITLQPSLKFNGGGHINHAIFWKILSAKGGGLPKGDLIDLIKNNFGSFDAMKAELTA 94
Dp_SOD2  INEIITLQPSLKFNGGGHINHSIFWKILSPKGGGLPKGDLMELIKNNYGSFDAMKAELTA 120
          *****:***** *****:*****:*****:*****:*****

Db_SOD2  ASVGIQSGSGWGLGWNPISGRLRIATCANQDPLQPTTGLVPLFGIDVWEHAYYLQYKNVR 154
Dp_SOD2  ASVGIQSGSGWGLGWNPNVNGRLRIATCANQDPLQPTAGLVPLFGIDVWEHAYYLQYKNVR 180
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Db_SOD2  PDYVKAIFDIANWEEVGNRLAAARMKA 181
Dp_SOD2  PDYVKAIFDIANWEEVGNRLAAARMKA 207
          *****
```

Figure 44 : Alignement sous ClustalOmega des séquences peptidiques de SOD2 chez *D. r. bugensis* (Db) et *D. polymorpha* (Dp). *Légende :* "*", résidus conservés / ":", résidus partageant les mêmes propriétés physicochimiques / ".", résidus présentant une similarité.

L'alignement intégrant la séquence Mn-SOD de *Mytilus edulis* (CAG2223474.1; PM 25311 Da / pI 6,44) indique 53,1% d'identité entre dreissènes et moules marines ; de nouveau la partie initiale de la protéine est la plus variable, la Mn-SOD de la moule bleue étant plus longue que celle de la moule zébrée d'une vingtaine d'acides aminés (figure 45).

```

Db_SOD2 -----KDIMITIHHQKHHQ 13
Dp_SOD2 -----MLGTGRLKHTLPDLPYEYNALEPCISHDIMMIHHQKHHQ 39
Me_SOD2 MLSSSATVLRSVLTKAAGYGTAVTCNRTKHTLPDLPYDYNALPEYVSAEIMQLHHSKHHN 60
          : ** : ** . ** :

Db_SOD2 TYINNLNATEEKLAAAVEKKNINEIITLQPSLKFNNGGHHINHAIFWKILSAKGGGLPKGD 73
Dp_SOD2 TYINNLNATEEKLAVAVEKKNINEIITLQPSLKFNNGGHHINHSIFWKILSPKGGGLPKGD 99
Me_SOD2 TYVNNLNVAEEKLAEAVAKNNVNQIIQLQPALKFNGGGHNLNHSIFWEVLSPSGGGLPSGD 120
          **:****.:***** ** *:*:*:** ***:*****:***:***:***.*****.**

Db_SOD2 LIDLKNNFSGFDAMKAELTAASVGIQSGSGWGLGWNPISGRLRIATCANQDPLQPTTGL 133
Dp_SOD2 LMELIKNNYGSFDAMKAELTAASVGIQSGSGWGLGWNPNVNGRLRIATCANQDPLQPTAGL 159
Me_SOD2 LKEMIIRDFDSFDKMKKQVSDAAVAVQSGSGWSWLGYNPVSGLRIAACANQDPLLPPTTGL 180
          * :*: .:*.*** ** ::*:*:*****:***:***:*****:***** **:**

Db_SOD2 VPLFGIDVWEHAYYLQYKNVRPDYVKAIFDIANWEEVGNRLAAARMKA 181
Dp_SOD2 VPLFGIDVWEHAYYLQYKNVRPDYVKAIFDIANWEEVGNRLAAARMKA 207
ME_SOD2 IPLFGIDVWEHAYYLQYKNVRPDYVSAIWNIVNWNENVASRLQEAKMEN 228
          :*****:*****.***:*.***:*.*** **:*:

```

Figure 45 : Alignement sous ClustalOmega de la séquence peptidique de SOD1 chez *M. edulis* avec celles de *D. polymorpha* (Dp) et *D. r. bugensis* (Db). **Légende :** "*", résidus conservés / ":", résidus partageant les mêmes propriétés physicochimiques / ".", résidus présentant une similarité.

III.3.4 Confrontation avec la littérature

Les superoxyde dismutases assurent une fonction antioxydante majeure en catalysant la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène, bloquant ainsi la production de radicaux plus réactionnels à partir de l'anion superoxyde. La Mn-SOD (SOD2) mitochondriale est indispensable aux êtres vivants aérobies dans la mesure où son absence est létale (souris Knock-out). La suppression de la Cu/Zn-SOD (SOD1) n'est pas létale mais les souris dépourvues de SOD1 développent une grande quantité de pathologies (Hongbin Liu et coll. 2000). Cette protéine est bien conservée et particulièrement résistante au stress oxydant. De plus, la Cu/Zn-SOD est régulée à différents niveaux. Ainsi, le promoteur de son gène contient des éléments de réponse à toute une variété de facteurs de transcription (Milani et coll. 2011). D'autre part, après phosphorylation, elle peut être transloquée dans le noyau et servir à son tour de facteur de transcription (Tsang et coll. 2014). La localisation cellulaire de la Cu/Zn-SOD est multiple. Initialement décrite dans le cytosol, elle est aussi présente au niveau de la membrane mitochondriale où elle limite le relargage du cytochrome C dans le cytosol et donc verrouille une voie apoptotique (Zapico et Ubelaker 2013). De plus, elle est elle-même sujette à des oxydations et, après oxydation, peut interagir avec le protéasome et inhiber certaines de ses

protéases (Pecheur et coll. 2005). L'ensemble de ces éléments font de la Cu/Zn-SOD un acteur essentiel des mécanismes de réponse au stress.

En écotoxicologie, les superoxyde dismutases sont d'ores et déjà utilisées de façon courante comme biomarqueurs, aussi bien au niveau transcriptionnel, protéique, qu'enzymatique. De nombreuses études mesurent l'activité de l'enzyme chez les bivalves (Choi et coll. 2022 ; Curpan et coll. 2022 ; Teng et coll. 2021 ; Abdel-Latif et coll. 2020 ; Albayrak et coll. 2019 ; Binelli et coll. 2015 ; Faria et coll. 2009) et des résultats contradictoires peuvent être observés, avec des augmentations et diminutions possiblement corrélées à la concentration et le type de contaminant. (Abdel-Latif et coll. 2020), dans une revue sur les effets du titane sur la physiologie de bivalves observent des diminutions d'activité de SOD1 chez *M. coruscus* et *Limnoperna fortunei* à des concentrations autour de 20 µg/L et des augmentations de SOD1 chez *Unio tumideis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* et *M. coruscus* à des concentrations inférieures au µg/L. Aucune modification d'activité n'est décrite chez *Dreissena polymorpha*. Lors d'une analyse d'une exposition à du cuivre, chez *L. fortunei* une augmentation de son activité est observée dans les branchies. Les auteurs concluent que le titane peut aussi interagir avec les métaux lourds ou les produits chimiques organiques et favoriser leur accumulation et leur toxicité. Dans une revue sur *D. polymorpha*, Binelli et coll. (2015) observent également des résultats contradictoires avec des augmentations ou diminutions d'activité en fonction des contaminants, des durées d'exposition et des conditions de santé des moules prélevées. Faria et coll. (2009) en revanche, observent systématiquement une augmentation de l'activité de SOD1 dans la glande digestive, (cadmium, 34 µg/L ; mercure, 40 µg/L ; aroclor1254, un mélange de PCB, 150 ng/L) lors d'expositions de 5 jours chez *D. polymorpha*. Choi et coll. (2022), lors d'une exposition de moules méditerranéennes à des microfibres, observent que l'activité de la SOD est augmentée de façon dose-dépendante. En ce qui concerne les études mesurant les quantités de SOD, elles sont moins nombreuses (Schuster et coll. 2021 ; Hu et coll. 2014 ; Gómez-Mendikute et Cajaraville 2003 ; Manduzio et coll. 2003). A titre d'exemple, Song et coll. (2016) ont mis en évidence une diminution de l'abondance de SOD1 dans la gonade de *Perna viridis* mâles exposés à un mélange de BaP et de DDT (10 mg/L chacun) pendant 7 jours.

L'ensemble de ces éléments bibliographiques illustrent la plasticité des réponses SOD1 et amènent à les considérer comme des systèmes d'alerte, avec un suivi qui reste justifié en écotoxicologie.

IV. Les DAP participant au cytosquelette et à son organisation

Le cytosquelette définit l'architecture de la cellule et, de ce fait, le maintien de son intégrité structurale mais il est également impliqué dans de nombreux processus qui organisent la vie cellulaire : trafic cellulaire, progression du cycle, transduction du signal, transport, motilité. Il est composé de trois principaux types de filaments protéiques : les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. L'actine et la tubuline sont les plus abondants parmi tous les constituants du cytosquelette, et même de la cellule. Leur organisation particulière demande l'intervention d'un groupe de chaperonnes cytosoliques appelé TriC ou CCT pour cytosolic chaperonin containing TCP-1, groupe qui a été adjoint ici à la catégorie cytosquelette (Lopez-Fanarraga et coll. 2001). Ainsi, parmi les 24 éléments de cette catégorie, 7 font partie du TriC et se retrouvent dans les processus biologiques GO 0050821, stabilisation des protéines et GO 0006457, repliement des protéines (figure 46). Deux autres processus biologiques émergent de cette catégorie : l'organisation des microfilaments d'actine (GO 0110053) et la formation d'extensions membranaires telles les cils (GO 0120031), respectivement en violet et en jaune.

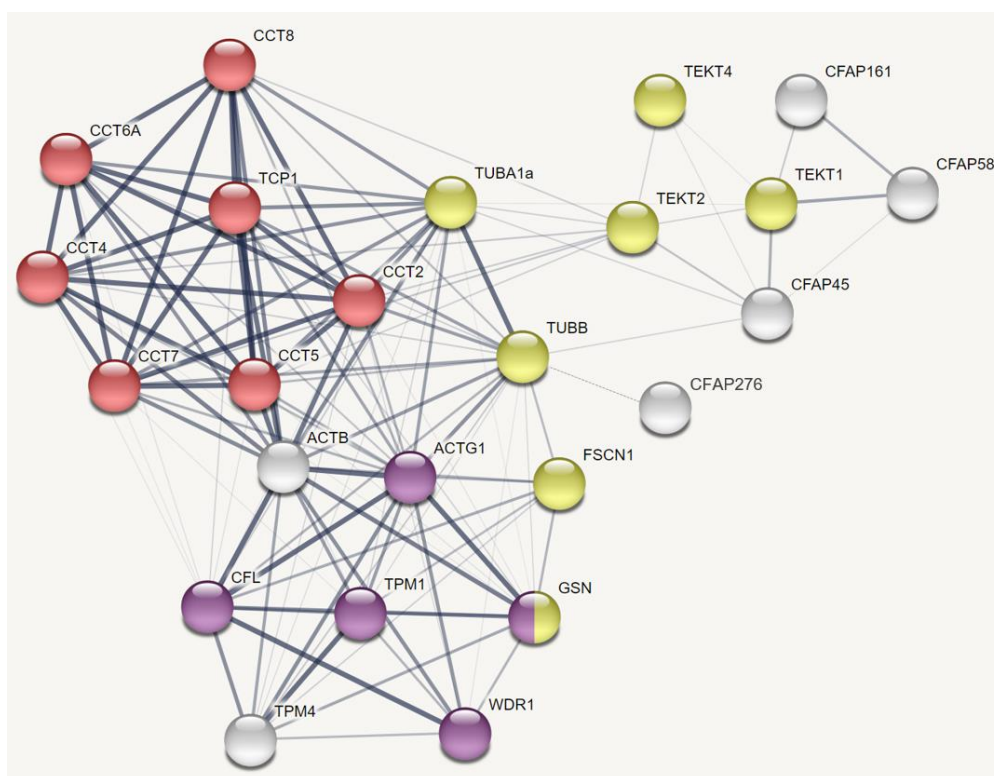


Figure 46 : String Interactions au sein de la catégorie CYTOSQUELETTE. En rouge, les protéines du système chaperon TriC, (GO 0006457) ; en violet, les protéines du processus Régulation et organisation des microfilaments (GO 0110053) ; en jaune, les protéines impliquées dans la formation d'extensions membranaires (GO 0120031). L'épaisseur des traits représente le niveau de confiance des interactions détectées par String (<https://string-db.org/Interactions>).

IV.1. Cas des microfilaments

IV.1.1. Présentation de l'actine

L'actine est la protéine la plus abondante de la plupart des cellules eucaryotes. Elle est hautement conservée et participe à plus d'interactions protéine-protéine que toute autre protéine connue (Dominguez et Holmes 2011). L'assemblage et l'organisation spatiale des microfilaments sont régulés par l'expression de pools distincts d'isoformes d'actine ainsi que par leur interaction avec un large répertoire d'ARP (actin related protein). Tous les vertébrés ont deux isoformes d'actine cytoplasmique non musculaire, l'isoforme bêta et l'isoforme gamma. Cependant, ces isoformes ne diffèrent que par quelques acides aminés ce qui rend difficile leur caractérisation en spectrométrie de masse. L'isoforme bêta a 3 résidus glutamate en début de séquence et un résidu valine en position 10, alors que ce sont 3 résidus aspartate et un résidu isoleucine pour l'isoforme gamma (Kudryashov et Reisler 2013). Chez les non vertébrés, la distinction des isoformes n'est pas toujours faite et il est commun de nommer l'actine cytoplasmique sans spécifier l'isoforme.

L'actine est une protéine de 42 kDa appartenant à une superfamille structurale regroupant les hexokinases et les protéines HSP70. La chaîne polypeptidique de 375 acides aminés de l'actine se replie en deux domaines α/β majeurs. En raison de leur emplacement dans le filament d'actine, les deux domaines principaux de l'actine sont nommés domaines externe et interne. De façon conventionnelle, cependant, une nomenclature à quatre sous-domaines a été adoptée. Au sommet du domaine 2, les résidus 39 à 51 sont désordonnés et forment une boucle de liaison à la DNase I (ou boucle D). Les sous-domaines 1 et 3 sont structurellement liés et ont probablement émergé de la duplication de gènes, tandis que les sous-domaines 2 et 4 peuvent être considérés comme de grandes insertions dans les sous-domaines 1 et 3 (Dominguez et Holmes 2011).

IV.1.2. Mise en évidence dans le jeu de données

Les tableaux 16 et 17 regroupent les DAP impliquées dans la dynamique du réseau de microfilaments, avec principalement l'actine. Ces résultats ne seront pas commentés dans ce paragraphe. Ils seront discutés dans le paragraphe IV.4 qui traitera de l'ensemble les éléments obtenus sur le cytosquelette.

Tableau 16 : Occurrences des DAP actine

actines											
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
STM21K	<i>M. e. p.</i>	1913	↑	42	5,3	<i>Crassostrea ariakensis</i>	ABW97741.1	41798	5,30	41	38
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7544	↓	40	5,2	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5386503.1	41766	5,29	36	20
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7856	↓	27	5,5	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	BAB60813.1	44513	6,62	25	20
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11088	↓	42	5,3	<i>Crassostrea ariakensis</i>	ABW97741.1	41798	5,30	47	42
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11160	↑	40	5,2	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AAD40314.1	41747	5,46	38	16
CAN3LH	<i>M. e.</i>	12888	↓	17	5,4	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2214161.1	22615	5,34	16	7
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11370	↑	32	4,9	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	BAB60813.1	44513	6,62	26	27
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11676	↑	25	5,1	<i>Spodoptera littoralis</i>	Q11212.1	18032	5,76	69	24
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11515	↑	24	5,4	<i>Haliotis iris</i>	AAX19287.1	41945	5,29	36	12
HAP 7	<i>M. e.</i>	652	↓	42	5,3	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	BAB60813.1	44513	6,62	12	5
HAP 7	<i>M. e.</i>	710	↓	42	5,5	<i>Pinctada fucata</i>	ALK82320.1	41834	5,30	11	51
HAP 14	<i>M. e.</i>	1238	↑	42	5,3	<i>Crassostrea gigas</i>	BAB84579.1	41744	5,30	47	16
HAP 14	<i>M. e.</i>	1277	↑	40	5,9	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AAD40314.1	41747	5,46	18	5
HAP 14	<i>M. e.</i>	1548	↑	26	5,4	<i>Crassostrea gigas</i>	BAB84579.1	41744	5,30	32	11
CB153	<i>M. e.</i>	3046	↓	18	5,2	<i>Meretrix meretrix</i>	AEK81538.1	42200	5,30	23	6
CB153	<i>M. e.</i>	2542	↓	39	5,1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI70808.1	42212	5,29	10	4
CB153	<i>M. e.</i>	2582	↓	36	4,7	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2233114.1	41830	5,29	30	7
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	638	↓	42	5,2	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5419237.1	41792	5,30	36	10
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	20062	↓	42	5,6	<i>Dreissena polymorpha</i>	AAC32224.1	41853	5,30	47	13

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e.p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r. bugensis*) ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs} est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pl_{obs} le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pl son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

Tableau 17 : Occurrences des DAP associées à l'actine

Composants du cytosquelette associés aux microfilaments d'actine													
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pI _{obs}	abrev.	Nom	Espèce de criblage	Ref.	PM	pI	% cov.	pep.
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11797	↑	21	5,7	CFL	cofilin	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI10885.1	16635	7,75	30	5
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11810	↑	19	5,9	CFL	cofilin	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI10885.1	16635	7,75	15	4
HAP 14	<i>M. e.</i>	1679	↑	15	6,6	CFL	cofilin	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	XP_002735215.1	16119	5,81	13	8
CB153	<i>M. e.</i>	3089	↓	16	6,5	CFL	cofilin	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI10886.1	16166	6,32	47	5
STM21K	<i>M. e. p.</i>	1738	↑	56	5,6	FSCN1	fascin	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	OPL21594.1	56385	6,04	36	16
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10930	↑	56	6,0	FSCN1	fascin	<i>Crassostrea gigas</i>	EKC27420.1	56081	6,21	4	4
HAP 7	<i>M. e.</i>	517	↓	58	5,8	FSCN1	fascin	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	OPL21594.1	56385	6,04	4	2
HAP 7	<i>M. e.</i>	515	↑	58	5,7	FSCN1	fascin	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	OPL21594.1	56385	6,04	25	16
HAP 14	<i>M. e.</i>	1032	↓	48	6,2	FSCN1	fascin	<i>Crassostrea gigas</i>	EKC27420.1	56081	6,21	4	2
CB153	<i>M. e.</i>	2297	↓	55	6,2	FSCN1	fascin	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	OPL21594.1	56385	6,04	12	5
STM21K	<i>M. e. p.</i>	1909	↑	42	5,1	GSN	gelsolin	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5356702.1	41609	4,90	60	31
HAP 7	<i>M. e.</i>	648	↓	49	5,6	GSN	gelsolin	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5396430.1	42394	5,55	22	5
HAP 7	<i>M. e.</i>	667	↓	48	5,5	GSN	gelsolin	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2199148.1	42314	5,46	40	12
HAP 7	<i>M. e.</i>	669	↑	48	5,4	GSN	gelsolin	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5356702.1	41609	4,90	2	1
HAP 7	<i>M. e.</i>	675	↓	46	4,9	GSN	gelsolin	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5356702.1	41609	4,90	60	32
HAP 14	<i>M. e.</i>	1227	↓	43	6,1	GSN	gelsolin	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI12422.1	42152	5,78	11	4
HAP 14	<i>M. e.</i>	1188	↑	45	5,6	GSN	gelsolin	<i>Haliotis discus discus</i>	gi 126697490	23410	5,24	9	4
CB153	<i>M. e.</i>	2421	↑	45	4,8	GSN	gelsolin	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5356702.1	41609	4,90	60	32
CB153	<i>M. e.</i>	2463	↑	43	6,3	GSN	gelsolin	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI12422.1	42152	5,78	33	22
HAP 7	<i>M. e.</i>	877	↑	29	4,6	TPM	tropomyosin	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011437766.1	30408	4,76	59	18
CB153	<i>M. e.</i>	2637	↓	33	4,5	TPM	tropomyosin	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011437766.1	30408	4,76	21	12
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	821	↑	34	4,6	TPM	tropomyosin	<i>Ruditapes philippinarum</i>	BAH10155.1	30518	4,59	66	24
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	946	↓	30	4,7	TPM	tropomyosin	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_034322869.1	28888	4,62	88	42
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	26826	↑	28	4,7	TPM	tropomyosin	<i>Meretrix lyrata</i>	AEV23864.1	32819	4,64	50	19
STM21K	<i>M. e. p.</i>	1669	↑	64	7,0	WDR1	AIP1	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5418834.1	62729	6,02	25	14
HAP 7	<i>M. e.</i>	771	↑	37	6,3	WDR1	AIP1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AC5418834.1	62729	6,02	7	6
CB153	<i>M. e.</i>	2201	↓	65	6,7	WDR1	AIP1	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2254767.1	61177	6,03	24	8
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7226	↑	67	6,5	WDR1	AIP1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI77899.1	64363	6,63	25	14
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	82002	↑	67	6,6	WDR1	AIP1	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5418834.1	62729	6,02	37	16

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e.p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r. bugensis*) ; GeneC sa référence GeneCards ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs.} est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pI_{obs.} le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pI son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

IV.2. Cas des microtubules

IV.2.1. Présentation de la tubuline

La tubuline est le composant majoritaire des microtubules construits à partir d'hétérodimères d' α et de β -tubuline. Leur dynamique de formation/dissociation est un élément clé de nombreux processus cellulaires, contribuant notamment à l'architecture de la cellule, la division, la polarité et la motilité cellulaires. Dans certaines structures telles les cils, l'instabilité dynamique est supprimée, les microtubules sont dans un état stable (Orbach et Howard 2019). Des centres organisateurs participent à la construction du réseau de microtubules avec des structures spécialisées telles que les axonèmes, qui sont à la base des cils et des flagelles, les centrioles, éléments centraux des centrosomes et les bandes marginales des plaquettes sanguines. De nombreux facteurs cellulaires modulent la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules.

Les filaments de microtubules sont toujours assemblés à partir de dimères hautement conservés d' α - et de β -tubuline et le nombre de protofilaments dans un microtubule est une caractéristique fondamentale qui contrôle la largeur du filament et la configuration des routages dans le trafic cellulaire. Classiquement, un microtubule comporte 13 protofilaments qui s'alignent parallèlement au grand axe du microtubule et les pistes pour les transports intracellulaires sont linéaires (Amos et Schlieper 2005). En revanche, dans les microtubules comportant un autre nombre de protofilaments, il y a une torsion super-hélicoïdale des protofilaments le long de l'axe long du polymère qui entraîne des trajectoires en spirale. Cette configuration expliquerait le transport directionnel dans des environnements cellulaires denses (Amos et Schlieper 2005). Ainsi, chez *Caenorhabditis elegans*, plusieurs types de cellules ont des microtubules à 11 protofilaments, tandis que les neurones récepteurs tactiles ont des microtubules à 15 protofilaments (Chalfie et Thomson 1982). Des études de biologie cellulaire ont révélé une corrélation entre l'expression de l'isotype de la tubuline et le nombre de protofilaments des microtubules. Ti et coll. (2018) ont utilisé une tubuline humaine recombinante pour montrer que les isotypes de β -tubuline peuvent réguler le nombre et la stabilité des protofilaments des microtubules. Les différences de séquence entre les isotypes se traduisent par des déplacements structuraux « en accordéon », relativement petits répartis dans la séquence. Les modèles atomiques de microtubules avec différents nombres de protofilaments indiquent que des variations dans la séquence primaire de la β -tubuline humaine peuvent coder pour des architectures distinctes, impliquant que la plasticité de la conformation des microtubules est une propriété intrinsèque codée dans la séquence primaire de la β -tubuline. Il existe un lien entre la plasticité de la sous-unité de tubuline, le nombre de protofilaments et la stabilité des microtubules.

Chez les mammifères, la tubuline représente environ 3 à 4 % des protéines totales dans les cellules. Chez l'homme, huit gènes α -tubuline et sept gènes β -tubuline ont été identifiés (Verdier-Pinard et coll. 2009). L' α -tubuline est une protéine de 50 kDa, composée généralement de 451 acides aminés, avec des domaines de liaison à la β -tubuline et un site de liaison au GTP. La β -tubuline, une protéine de poids moléculaire similaire avec généralement 447 acides aminés et des domaines de liaison à l' α -tubuline et au GTP. Les molécules de GTP sont hydrolysées en GDP au cours de l'assemblage. L'incorporation de variants spécifiques d' α -tubuline ou de β -tubuline (connus sous le nom d'isotypes de tubuline) ou encore les modifications post-traductionnelles (PTM) des tubulines peuvent moduler fonctionnellement les microtubules. Chaque isotype peut subir d'importantes modifications post-traductionnelles, notamment des phosphorylations, des acétylations, des polyglutamylations et des tyrosinations. Par conséquent, les hétérodimères de tubuline peuvent être formés d'un grand nombre de combinaisons de tubulines (Verdier-Pinard et coll. 2009).

IV.2.2. Mise en évidence dans le jeu de données

Les tableaux suivants regroupent les protéines en relation avec le réseau de microtubules. Comme pour le réseau de microfilaments, les résultats ne seront pas commentés dans ce paragraphe. Ils seront discutés dans le paragraphe IV.4 qui rassemblera les éléments obtenus sur le cytosquelette. Dans les tableaux 18 et 19 sont répertoriés les DAP identifiés, respectivement, comme α -tubuline et β -tubuline. Le tableau 20 rassemble des protéines associées aux microtubules.

Tableau 18 : Occurrences des DAP tubuline alpha

sous-unités alpha des tubulines											
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pI _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pI	% cov.	pep.
STM21K	<i>M. e. p.</i>	1721	↑	53	5,2	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021370650.1	50742	4,97	35	68
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7252	↑	55	5,0	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2220312.1	50196	4,91	64	48
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11270	↓	37	5,5	<i>Brachionus urceolaris</i>	AFR46110.1	36158	6,16	24	7
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11316	↑	36	5,4	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AIJ27191.1	30026	5,23	32	15
HAP 7	<i>M. e.</i>	1329	↑	68	5,9	<i>Crassostrea gigas</i>	Q5H7U8_CRAGI	50742	4,97	30	7
HAP 7	<i>M. e.</i>	528	↓	58	5,1	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2220312.1	50196	4,91	64	46
HAP 7	<i>M. e.</i>	629	↓	49	5,9	<i>Hirudo medicinalis</i>	AAB07727.1	50776	4,94	8	22
HAP 7	<i>M. e.</i>	986	↓	20	4,8	<i>Enchytraeus buchholzi</i>	ABO28789.1	42323	5,65	21	28
CB153	<i>M. e.</i>	2556	↑	38	5,3	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AIJ27191.1	30026	5,23	16	3
CB153	<i>M. e.</i>	2621	↓	34	5,3	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XP_001178141.1	50756	4,94	19	5
CB153	<i>M. e.</i>	2625	↓	34	5,4	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XP_001178141.1	50756	4,94	19	6
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	663	↓	42	5,7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_497663.1	50113	5,00	44	14
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1219	↑	27	5,3	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011428863.1	50090	4,94	29	18
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1331	↓	19	4,7	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011428863.1	50090	4,94	34	17
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1351	↓	17	4,7	<i>Pinctada fucata</i>	BAJ14323.1	16244	4,76	43	9
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	607	↑	45	6,0	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_021370666.1	50110	4,94	40	11

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e. p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r. bugensis*) ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs}. est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pI_{obs}. le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les

indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pl son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

Tableau 19 : Occurrences des DAP tubuline bêta

sous-unités beta des tubulines											
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7434	↓	46	6,0	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5422817.1	49893	4,77	52	22
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7605	↓	34	5,7	<i>Mytilus coruscus</i>	CAC5422817.1	49893	4,77	14	9
CAN3YP	<i>M. e.</i>	8011	↓	20	4,9	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2207679.1	50005	4,77	50	14
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11417	↑	32	5,0	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2210582.1	50000	4,77	18	10
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11717	↑	24	4,8	<i>Enchytraeus buchholzi</i>	ABO28789.1	42323	5,65	21	28
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11208	↑	39	5,5	<i>Fasciola hepatica</i>	CAO79608.1	49600	4,85	33	40
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11398	↑	33	5,2	<i>Schistosoma japonicum</i>	CAX70940.1	37416	5,29	25	9
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10953	↓	53	5,0	<i>Scrobicularia plana</i>	AFV81455.1	50406	4,76	41	26
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11271	↓	37	5,7	<i>Crassostrea gigas</i>	AAU93877.1	42258	5,75	40	46
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10940	↓	53	5,0	<i>Crassostrea gigas</i>	BAD80737.1	50371	4,79	44	26
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11084	↓	46	6,2	<i>Crassostrea gigas</i>	BAD80737.1	50371	4,79	51	22
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11153	↓	40	5,7	<i>Exaiptasia pallida</i>	KXJ11484.1	49985	4,74	19	15
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11273	↓	37	5,4	<i>Exaiptasia pallida</i>	KXJ11484.1	49985	4,74	31	67
HAP 7	<i>M. e.</i>	1342	↑	31	5,0	<i>Paracentrotus lividus</i>	gi 135489	50475	4,73	8	24
HAP 7	<i>M. e.</i>	545	↓	55	5,2	<i>Crassostrea gigas</i>	BAD80737.1	50371	4,79	17	42
HAP 7	<i>M. e.</i>	585	↓	51	5,1	<i>Crassostrea gigas</i>	BAD80737.1	50731	4,79	42	17
HAP 7	<i>M. e.</i>	934	↑	24	4,4	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011448542.1	49936	4,76	21	13
HAP 14	<i>M. e.</i>	1842	↑	50	4,6	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2202739.1	50374	4,77	21	8
HAP 14	<i>M. e.</i>	1814	↓	27	5,5	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2210570.1	27212	4,75	10	2
HAP 14	<i>M. e.</i>	1855	↑	50	4,7	<i>Crassostrea gigas</i>	BAD80737.1	50371	4,79	37	31
HAP 14	<i>M. e.</i>	1027	↑	50	4,8	<i>Crassostrea gigas</i>	BAD80737.1	50371	4,79	37	31
CB153	<i>M. e.</i>	2298	↓	52	4,8	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2202739.1	50374	4,77	21	8
CB153	<i>M. e.</i>	2758	↑	27	5,0	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI38263	29737	4,96	40	11
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1353	↓	18	4,7	<i>Fukomys damarensis</i>	XP_010607087.1	45309	5,62	36	16
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	508	↑	48	5,4	<i>Mizuhopecten yessoensi</i>	XP_021372086.1	49927	4,76	84	35
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1321	↓	21	6,3	<i>Pomacea canaliculata</i>	XP_025114800.1	49915	4,76	22	8
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	830	↑	38	5,5	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011448542.1	49936	4,76	47	18
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	644	↑	44	5,7	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011448542.2	49936	4,76	53	21
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	1039	↓	28	5,3	<i>Mercenaria mercenaria</i>	XP_045201517.1	49920	4,76	24	13

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e.p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r.*, *bugensis*) ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs} est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pl_{obs} le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pl son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

Tableau 20 : Occurrences des DAP associées aux microtubules

Composants associés aux microtubules													
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	abrev.	Nom	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
HAP 7	<i>M. e.</i>	354	↓	72	6,4	CFAP45	cilia/flagella-associated protein	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022327561.1	66249	8,59	12	7
HAP 7	<i>M. e.</i>	865	↑	31	6,2	CFAP161	cilia/flagella-associated protein	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021347475.1	32376	5,46	44	16
HAP 7	<i>M. e.</i>	991	↓	19	7,8	CFAP276	cilia/flagella-associated protein	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2248391.1	16645	6,79	53	11
HAP 14	<i>M. e.</i>	1781	↓	21	8,3	CFAP276	cilia/flagella-associated protein	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022296383.1	19266	6,80	32	11
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	182	↑	83	6,6	CFAP58	cilia/flagella-associated protein	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021374593.1	103230	8,49	21	10
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	869	↓	33	6,0	CFAP161	cilia/flagella-associated protein	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011417213.1	32642	6,02	37	13
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11046	↓	47	5,4	TEKT	tektin	<i>Crassostrea gigas</i>	EKC40190.1	48645	6,12	3	2
HAP 7	<i>M. e.</i>	624	↑	49	5,5	TEKT	tektin	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2226677.1	51194	5,64	40	26
HAP 14	<i>M. e.</i>	1145	↑	47	5,7	TEKT	tektin	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2217750.1	49351	5,81	5	6
CB153	<i>M. e.</i>	2372	↓	48	5,4	TEKT	tektin	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2226677.1	51194	5,64	10	3
CB153	<i>M. e.</i>	2381	↓	48	5,3	TEKT	tektin	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2217750.1	49351	5,81	14	3
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	495	↑	50	5,6	TEKT	tektin	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011416098.2	52519	5,53	23	10
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	546	↑	47	5,5	TEKT	tektin	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022286938.1	49356	5,53	58	25
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7222	↑	68	5,4	VIM	intermediate filament	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI79441.1	66415	5,34	24	17
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7223	↑	68	5,3	VIM	intermediate filament	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI79441.1	66415	5,34	4	10
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7227	↑	68	5,3	VIM	intermediate filament	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI79441.1	66415	5,34	27	34
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7347	↓	50	5,4	VIM	intermediate filament	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022321429.1	53643	4,94	44	25
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10841	↑	65	5,5	VIM	intermediate filament	<i>Crassostrea gigas</i>	EKC18758.1	69246	5,38	3	10
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10842	↑	65	5,5	VIM	intermediate filament	<i>Crassostrea gigas</i>	EKC18758.1	69246	5,38	2	4
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10843	↑	65	5,4	VIM	intermediate filament	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI79441.1	66415	5,34	27	18
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10845	↑	64	5,5	VIM	intermediate filament	<i>Mytilus edulis</i>	GE747041	30937	8,86	23	5
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10960	↑	53	5,3	VIM	intermediate filament	<i>Mytilus californianus</i>	GE750313	31541	7,63	29	9
HAP 7	<i>M. e.</i>	421	↓	66	5,2	VIM	intermediate filament	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI79441.1	66415	5,34	28	21
HAP 7	<i>M. e.</i>	423	↑	66	5,3	VIM	intermediate filament	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI79441.1	66415	5,34	28	21
HAP 7	<i>M. e.</i>	585	↓	51	5,1	VIM	intermediate filament	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022320109.1	66336	5,70	48	29
CB153	<i>M. e.</i>	2162	↓	69	5,3	VIM	intermediate filament	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI79441.1	66415	5,34	27	18
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	435	↓	55	5,3	VIM	intermediate filament	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022321429.1	53643	4,94	43	15
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	597	↑	46	4,7	VIM	intermediate filament	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_019924107.1	69288	5,38	51	25

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e.p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r. bugensis*) ; GeneC sa référence GeneCards ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs} est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pl_{obs} le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pl son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

IV.3. Cas du TriC

IV.3.1. Présentation du complexe

Le complexe multiprotéique TriC ou CCT pour cytosolic chaperonin containing TCP-1 est un élément clé de la formation de l'actine et de la tubuline pour leur association en microfilaments, d'une part et microtubules, d'autre part. Ce complexe est une structure en double anneau en forme de tonneau (figure 47). Chaque anneau contient huit sous-unités, codées par des gènes individuels, nommées CCT α à CCT θ ou CCT1 à CCT8. Ces sous-unités partagent la même architecture générale. Les domaines équatoriaux ont une homologie de séquence élevée avec un site de liaison à l'ATP. Ils sont reliés aux domaines apicaux par une région de liaison flexible. Les domaines apicaux, impliqués dans la liaison au substrat, présentent les séquences les plus divergentes entre les sous-unités (Brackley et Grantham 2009).

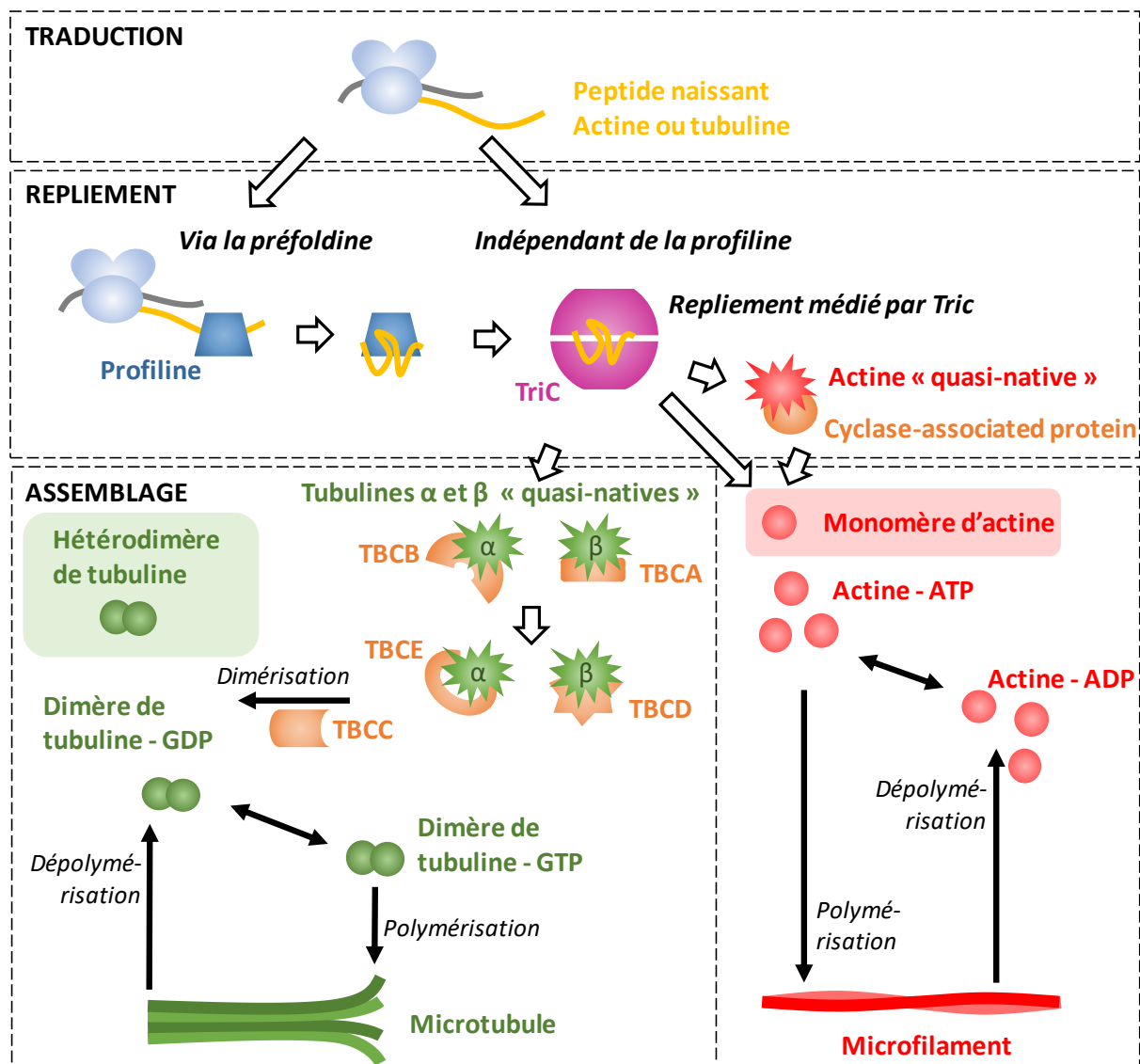


Figure 47 : Positionnement du TriC dans le folding et l'assemblage de l'actine et de la tubuline, d'après Lundin, Leroux, et Stirling (2010). **TRADUCTION** - Après sa traduction, le peptide naissant d'actine ou de tubuline α ou β (jaune) rejoint indirectement (préfoldine, bleu) ou directement le TriC (en violet). **REPLIEMENT** - Le TriC assure le repliement des protéines et libère de la tubuline α ou β quasi-native ou de l'actine sous forme quasi-native ou monomérique. **ASSEMBLAGE** - En rouge, l'actine liée à l'ATP s'assemble en microfilaments ; la dépolymérisation relargue des monomères liés à l'ADP. En vert, les tubulines α et β liées au GTP s'associent respectivement à TBCB et TBCA puis sont transférées à TBCE et TBCD. Ces complexes recrutent TBCC ; le GTP est hydrolysé et les hétérodimères α/β sont formés. Le GDP de la sous-unité β est remplacé par un GTP et l'hétérodimère s'associe à un microtubule ; la dépolymérisation libère des hétérodimères liés au GDP. TBC, Tubulin Folding Cofactor.

Le complexe TriC est impliqué dans les réarrangements du cytosquelette et, par conséquent, aussi bien dans les événements de morphogénèse que dans la progression du cycle cellulaire. *In vitro*, 4 sous-unités (TCP1 α , TCP1 γ , TCP1 ζ et TCP1 θ) agissent comme des protéines associées aux microtubules dans les essais d'assemblage de microtubules. Dans les cellules de mammifères en culture, le monomère TCP1 ϵ s'associe aux microfilaments d'actine et peut affecter la forme des cellules. Ainsi,

lorsque les niveaux de TCP1 ϵ sont réduits, les cellules deviennent étroites, tandis que les cellules riches en monomères TCP1 ϵ s'étalent. De plus, il a été démontré que, séparément, les sous-unités du TriC interviennent dans la migration cellulaire (Vallin et Grantham 2019).

IV.3.2. Mise en évidence dans le jeu de données

Le tableau 21 regroupe les DAP appartenant au TriC (complexe TCP1) qui, bien qu'il s'agisse de chaperonnes, sont présentées dans la catégorie cytosquelette de ce mémoire du fait de leur implication dans les réarrangements moléculaires de l'actine et de la tubuline. Les résultats seront discutés dans le paragraphe IV.4 avec l'ensemble des éléments obtenus sur le cytosquelette.

Tableau 21 : Occurrences des DAP appartenant au complexe TCP1

Composants du TCP1 ring complex (TriC)													
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	abrev.	Nom	Espèce de criblage	Ref	PM	pl	% cov.	pep.
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7245	↑	66	6,2	TCP1	TCP1 alpha	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI19553.1	60830	6,03	12	7
CB153	<i>M. e.</i>	2239	↓	61	6,5	TCP1	TCP1 alpha	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2197075.1	60565	6,16	23	9
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	8514	↑	25	5,0	TCP1	TCP1 alpha	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022328027.1	59842	6,16	25	11
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7241	↑	66	5,6	CCT2	TCP1 beta	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_022286485.1	57528	6,03	57	26
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7246	↑	66	5,6	CCT2	TCP1 beta	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_022286485.1	57528	6,03	56	26
HAP 14	<i>M. e.</i>	945	↓	55	5,6	CCT2	TCP1 beta	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2197317.1	70671	8,65	56	26
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	424	↓	57	6,2	CCT4	TCP1 delta	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021372676.1	57342	7,51	70	32
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	583	↑	46	6,1	CCT5	TCP1 epsilon	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022344660.1	59375	6,46	26	11
HAP 14	<i>M. e.</i>	1041	↓	51	7,6	CCT5	TCP1 epsilon	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2185835.1	60393	7,98	8	5
CB153	<i>M. e.</i>	2286	↓	55	6,9	CCT5	TCP1 epsilon	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2185835.1	60393	7,98	8	5
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7250	↑	65	6,4	CCT6A	TCP1 zeta	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI46620.1	58052	6,31	15	7
CB153	<i>M. e.</i>	2241	↓	61	6,7	CCT6A	TCP1 zeta	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI46620.1	58052	6,31	15	7
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7277	↑	62	6,1	CCT7	TCP1 eta	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDH88911.1	59090	5,97	28	12
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	705	↑	42	5,7	CCT7	TCP1 eta	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022288360.1	59277	6,10	43	18
HAP 7	<i>M. e.</i>	483	↓	63	5,8	CCT8	TCP1 theta	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022294447.1	60340	5,31	63	30
HAP 7	<i>M. e.</i>	583	↑	55	6,4	CCT8	TCP1 theta	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2208110.1	57834	5,33	60	30

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e.p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r.*, *bugensis*) ; GeneC sa référence GeneCards ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs.} est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pl_{obs.} le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pl son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

IV.4. Stabilité et dynamique du cytosquelette - Confrontation avec la littérature

Actine et tubuline sont les constituants du cytosquelette retrouvés dans toutes les cellules eucaryotes, ils forment respectivement les réseaux de microfilaments et de microtubules. Ces deux

réseaux ne sont pas indépendants l'un de l'autre, au contraire, des interconnexions fonctionnelles existent. L'actine forme une barrière physique qui freine la croissance des microtubules en périphérie de cellules et les microtubules favorisent la polymérisation de l'actine en concentrant localement des protéines favorisant cette polymérisation (Dogterom et Koenderink 2019).

Dans toutes les études, des DAP ont été identifiées en tant qu'actine. Cependant, une partie de ces protéoformes ne sont pas au poids moléculaire de 42 kDa et au point isoélectrique de 5,3 attendus (tableau 16). Une majorité de ces DAP sont des formes modifiées de poids moléculaire inférieur à 42 kDa, suggérant que des clivages ont eu lieu au sein de la protéine, voire des épissages alternatifs. Ces résultats sont cohérents avec des études qui montrent que l'actine est un constituant du cytosquelette susceptible de nombreuses modifications post-traductionnelles et qu'il est particulièrement sensible à l'attaque des oxydants (Terman et Kashina 2013). Des formes tronquées de l'actine ont été également retrouvées dans l'analyse de protéome branchial de dreissènes après exposition à des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Consuelo Riva, Cristoni, et Binelli 2012).

De plus, l'actine peut être clivée par des caspases activées lors de l'apoptose, et des cathepsines libérées des lysosomes. Ces processus de protéolyse pourraient expliquer l'apparition de formes tronquées d'actine. La stabilité des microfilaments dépend d'un équilibre entre polymérisation et dépolymérisation des monomères/microfilaments d'actine. Des protéines présentant une affinité pour l'actine participent à cet équilibre. La cofiline (CFL), l'actin-interacting protein 1, la fascine, la gelsoline (GSN) et la tropomyosine, retrouvées dans nos travaux, appartiennent à cette catégorie (tableau 17). Dans la famille des protéines de liaison à l'actine, la CFL favorise la dépolymérisation des microfilaments et, en se liant aux monomères, prévient de nouvelles polymérisations. L'actin-interacting protein 1 (AIP1 alias WDR1) agit avec la cofiline et provoque la déstabilisation des microfilaments d'actine. En conditions normales, la cofiline accélère le renouvellement des microfilaments cytosoliques. En condition de stress, une surexpression de cofiline favorise l'entrée de l'actine dans le noyau et son maintien en filament nucléaire. Ces éléments font partie de l'ASR, l'Actin Stress Response (Figard et coll. 2019). La fascine (FSCN) joue un rôle dans l'organisation des faisceaux de filaments d'actine en périphérie de cellules. La tropomyosine est une protéine de liaison à l'actine qui stabilise les microfilaments. La gelsoline se fixe aux extrémités (+) de l'actine. Elle stabilise les microfilaments et intervient dans la ciliogénèse. Puisque les branchies sont impliquées dans le transport des ions, il est possible que les changements induits sur l'actine soient liés au phénomène de réorganisation du cytosquelette observé dans d'autres tissus présentant des propriétés osmorégulatrices (Izdebska et coll. 2018).

Étant donné que les microfilaments et le réseau de microtubules sont fortement interconnectés, une interférence avec le réseau d'actine peut affecter les microtubules, comme cela a été démontré

dans les kératinocytes humains en présence de niveaux élevés de calcium (J. Zhang et coll. 2005). Nos résultats montrent clairement des effets sur le réseau de microfilaments d'actine et également sur les microtubules. Comme pour l'actine, les variations concernant des protéoformes identifiées comme tubulines sont nombreuses avec fréquemment des tubulines parcellaires (avec un poids moléculaire inférieur à 50 kDa), aussi bien pour les sous-unités alpha que bêta, ces dernières étant celles les plus retrouvées (tableaux 18 et 19). De façon remarquable, certaines de ces protéoformes sont caractérisées par une partie C-terminale plus courte. C'est le cas des protéoformes 11208 de l'étude CAN3LH, 644 de l'étude Cd7Pol et 508 Cd7Bug (figure 48).

```
>ID11208(Mytilus edulis)_tubulin beta
MR EIVHIQAGQCGNQIGAK FWEVISDEHGIDPTGTYHGSDQLER INVYYNEATGGK YVPR AILVDLEPGTMDS
VRS GPFQGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAK GHYTEGAELVDSVLDVVR KEAESCDCLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTL
LISK IREEYPDRIMLTFSVVPSPK VSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTTPTYGDL
NHLVSATMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLAVNMVFPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYR ALTVPPELTQQMFDAKNMM
AACDPRHGRYLTVAAMFRGRMSMKEVDEQLLNQNK NSSYFVEWIPNNVKTAVCDIPPRGLKMSATFVGNSTAIQ
ELFKRVSEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATAEEEEGEFDEEEAEEA
Zone de recouvrement : PM 37264 Da/ pl 5,39
```

```
>ID644(Dreissena polymorpha)_tubulin beta
MR EIVHIQAGQCGNQIGAK FWEVISDEHGIDPTGTYHGSDQLER INVYYNEATGGK YVPR AILVDLEPGTMDS
VRS GPFQGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAK GHYTEGAELVDSVLDVVR KEAESCDCLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTL
LISK IREEYPDRIMLTFSVVPSPK VSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTTPTYGDL
NHLVSATMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLAVNMVFPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYR ALTVPPELTQQMFDAKNMM
AACDPRHGRYLTVAAMFRGRMSMKEVDEQLLNQNK NSSYFVEWIPNNVKTAVCDIPPRGLKMSATFVGNSTAIQ
ELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATAEEEEGEFDEEEGEGEAQ
Zone de recouvrement : PM 42016 Da/ pl 5,52
```

```
>ID508(Dreissena rostriformis bugensis)_tubulin beta
MR EIVHLQAGQCGNQIGAK FWEVISDEHGIDPTGTYHGSDQLER INVYYNEATGGK YVPR AVLVDLEPGTMDS
VRS GPFQGQVFRPDNFVFGQSGAGNNWAK GHYTEGAELVDSVLDVVR KEAESCDCLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTL
LISK IREEYPDRIMLTFSVVPSPK VSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTTPTYGDL
NHLVSATMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLAVNMVFPRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYR ALTVPPELTQQMFDAKNMM
AACDPRHGRYLTVAAMFRGRMSMKEVDEQLLNQNK NSSYFVEWIPNNVKTAVCDIPPRGLKMSATFVGNSTAIQ
ELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATAEEEEGEFDEEEGEHEET
Zone de recouvrement : PM 43356 Da/ pl 5,64
```

Figure 48 : Protéofomes de tubuline bêta présentant une partie C-terminale plus courte que celle de la forme canonique, chez *M. edulis* (11208, stress thermique, étude CAN3LH), chez *D. polymorpha* (644, exposition au Cadmium, étude Cd7Pol) et chez *D. r. bugensis* (508, exposition au Cadmium, étude Cd7Bug).

Ces protéofomes sont plus abondantes dans la condition de stress testée, ce qui pourrait rendre compte de la mise en place d'un mécanisme de résistance comme cela a déjà été démontré lors d'une exposition au cadmium par Gzyl et coll. (2015). Dans cette étude réalisée sur des cellules végétales, un réarrangement des microtubules a été observé, accompagné de diminutions des tubulines tyrosinylées et polyglutamylées au profit des formes détyrosinylées et acétylées ; ces dernières augmentent la stabilité des microtubules et, probablement, diminuent leur renouvellement. De plus, il a été

démontré que les parties C-terminales des tubulines sont impliquées dans les interactions avec les protéines régulatrices des microtubules. Les extrémités C-terminales sont des éléments intrinsèquement désordonnés qui font saillie de la zone compacte centrale du dimère de tubuline et forment une bosse dense chargée négativement à la surface des microtubules. Ces zones sont sujettes à de nombreuses modifications, en particulier des tyrosinations/ détyrosinations. Récemment, grâce à l'identification des enzymes catalysant ces modifications, un progrès a été fait dans la compréhension de la dynamique des microtubules (Magiera et coll. 2018). Ainsi, les modifications de la tubuline peuvent former une sorte de «code tubuline», qui programme des microtubules sélectionnés pour des fonctions intracellulaires spécifiques (Janke 2014). Pour illustrer ce concept, un effet positif sur la vitesse de croissance des microtubules a été récemment rapporté après le retrait de l'extrémité C-terminale de la β -tubuline à l'aide d'une protéolyse contrôlée (Fees et Moore 2018).

Parmi les protéines associées aux microtubules, trois identifications ressortent régulièrement, des protéines associées aux cils et flagelles (CFAP, Cilia/Flagella_Associated Proteins), des tektines et enfin un élément probablement de type filament intermédiaire (tableau 20). En ce qui concerne les CFAP, celles-ci ont été rencontrées à plusieurs reprises mais sans qu'une CFAP particulière ne se distingue d'une autre, ce qui n'en fait pas de bons candidats biomarqueurs même si cela souligne l'importance du réseau de microtubules dans les conditions testées. Une variation de tektines, sans qu'il soit possible de déterminer précisément s'il s'agit d'une forme 1, 2 ou 4, a été observée à 7 reprises. Les tektines sont des protéines qui s'assemblent avec les microtubules pour former les structures ciliaires ; leur présence dans les branchies de bivalve est cohérente avec la nature ciliée de l'épithélium branchial. Ces variations pourraient indiquer une désorganisation de la ciliature suite à l'exposition à des contaminants.

Enfin, dans la catégorie cytosquelette, une protéine a été retrouvée de façon répétée (15 sorties dans 6 des 8 études, tableau 20) mais s'est avérée difficile à identifier précisément si ce n'est que, comme la vimentine, il s'agit d'un filament intermédiaire, non neuronal et cytoplasmique. Les protéoformes de cette protéine ont un poids moléculaire compris entre 50 et 70 kDa (tableau 20). De façon remarquable, les spectres de masse réalisées à partir de ces spots matchent avec une séquence nucléotidique publiée dans NCBI en 2008 par A. Gracey et coll. (GenBank GE747041.1) obtenue après exposition de moules californiennes (*Mytilus californianus*) à différents stress environnementaux incluant la chaleur, le froid, les métaux lourds, l'hypoxie, l'émersion et la salinité. Une étude plus approfondie de cette protéine identifiée comme filament intermédiaire devrait être envisagée.

Parmi les sous-unités du TRiC, 7 sont retrouvées dans le jeu de données (tableau 21). Ce sont principalement les sous-unités alpha, bêta et epsilon. Le complexe multiprotéique TCP1, ou TRiC, présente une structure en double anneau en forme de tonneau qui intervient dans le folding de l'actine

et la tubuline et, également, dans la formation des structures ciliées (Lundin, Leroux, et Stirling 2010). Dans les études écotoxicologiques utilisant le modèle bivalve, des sous-unités du TCP1 apparaissent régulièrement comme modifiées. De plus, le suivi par qPCR de l'expression de sous-unités de ce complexe a déjà été réalisé. Ainsi, Meistertzheim et ses collègues ont observé des variations d'expression de la sous-unité 7 chez *Crassostrea gigas* exposé à un stress thermique (Meistertzheim et coll. 2007). Dans une étude visant à comparer les effets de stress multiples entre les 2 espèces *Mytilus trossulus* et *Mytilus galloprovincialis*, une augmentation d'abondance d'une sous-unité CCT2 (ou bêta) a été observée, plus marquée chez *Mytilus trossulus* que chez *Mytilus galloprovincialis* (Vasquez, Martinez, et Tomanek 2020).

Au final, parmi les DAP retrouvés régulièrement, nombre d'entre elles appartiennent à la catégorie cytosquelette, soit parce qu'il s'agit directement d'actine, de tubuline ou de filaments intermédiaires, soit parce qu'il s'agit de composants qui participent à la stabilisation et à la dynamique du cytosquelette. Une partie importante de ces DAP correspond à des formes partielles de l'actine cytoplasmique et des tubulines alpha et bêta. Leur suivi spécifique devrait faire l'objet d'une étude plus approfondie pour juger de leur pertinence comme outils en biosurveillance, un peu à l'instar du test Comète, qui met en évidence des profils distincts de fragmentation de l'ADN dans un contexte génotoxique.

V. Les DAP intervenant dans le métabolisme énergétique

Un des points permettant de décider de la résilience d'une espèce au stress est d'évaluer comment son métabolisme énergétique continue de générer de l'ATP alors que les voies normales sont perturbées. Le fait que les mitochondries sont des organelles particulièrement sollicitées dans la génération d'ATP mais aussi des organelles ciblées par les produits du stress oxydant, font d'elles le siège des voies perturbées. Des publications notent d'ores et déjà une différence de réaction entre un stress chronique et un stress aigu, menant à deux types de réactions au stress dans les voies métaboliques : un stress chronique provoque une accélération du métabolisme et du renouvellement de l'ATP qui permet de compenser les dépenses énergétiques supplémentaires pour une activité physiologique accrue, l'entretien cellulaire et la réparation des dommages. La détérioration de l'organisme vient d'un épuisement lent des différents acteurs dans le métabolisme (I. M. Sokolova 2013). La synthèse et le renouvellement des protéines sont parmi les consommateurs d'ATP les plus importants de la cellule et donc ce mécanisme de compensation peut aussi fonctionner dans un stress modéré. Au contraire, un stress intense aigu aura pour effet un ralentissement général de l'activité et une dépression métabolique. Cela permet de conserver les ressources métaboliques et de ralentir le changement défavorable du milieu intracellulaire dû à l'accumulation de déchets métaboliques aussi sources d'éléments oxydants (I. M. Sokolova 2013). Milanese et coll. (2019) remarquent que des dommages à l'ADN provoquent une réorganisation du métabolisme énergétique. En effet, ces dégâts provoquent un arrêt de la transcription, augmentant mécaniquement l'ATP disponible. Le surplus d'ATP a pour conséquence l'inhibition de la phosphofructokinase, ce qui favorise l'orientation métabolique du glucose vers la voie des pentoses phosphates et la régénération du NADPH.

V.1. Identification dans le jeu de données et mise en perspective

Le tableau 22 regroupe les DAP appartenant au métabolisme énergétique.

Tableau 22 : Occurrences des DAP enzymes du métabolisme énergétique

Enzymes de la glycolyse													
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	abrev.	Nom	Espèce de criblage	Ref.	PM	pl	% cov.	pep.
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11430	↑	32	7,1	ALDO	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011438339.2	38971	7,59	5	1
HAP 7	<i>M. e.</i>	733	↑	40	8,0	ALDO	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011438339.2	38971	7,59	27	7
HAP 7	<i>M. e.</i>	1300	↓	38	7,5	ALDO	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Crassostrea virginica</i>	XP_022340550.1	39043	7,61	47	15
HAP 14	<i>M. e.</i>	1248	↑	42	5,4	ALDO	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011438339.2	38971	7,59	6	2
HAP 14	<i>M. e.</i>	1335	↓	40	8,3	ALDO	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011438339.2	38971	7,59	55	24
HAP 14	<i>M. e.</i>	1343	↑	35	8,0	ALDO	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011438339.2	38971	7,59	35	6
CB153	<i>M. e.</i>	2472	↑	42	5,2	ALDO	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2228575.1	44530	8,69	6	2
CB153	<i>M. e.</i>	2547	↑	38	7,5	ALDO	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2228575.1	44530	8,69	8	2
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	780	↓	37	6,3	ALDO	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Meretrix meretrix</i>	ADP37376.1	39682	8,13	51	16
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1090	↑	28	5,2	ALDO	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Meretrix meretrix</i>	ADP37376.1	39682	8,13	21	8
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11666	↓	26	6,0	TPI	triosephosphate isomerase	<i>Mytilus edulis</i>	AAT06248.1	16257	4,93	45	32
HAP 7	<i>M. e.</i>	935	↑	24	6,0	TPI	triosephosphate isomerase	<i>Mytilus edulis</i>	AAT06248.1	16257	4,93	31	6
CB153	<i>M. e.</i>	2882	↓	23	6,2	TPI	triosephosphate isomerase	<i>Mytilus edulis</i>	AAT06248.1	16257	4,93	25	5
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7469	↑	44	6,9	PGK1	phosphoglycerate kinase 1	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2235253.1	42425	6,97	23	56
HAP 7	<i>M. e.</i>	688	↓	44	6,7	PGK1	phosphoglycerate kinase 1	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2235253.1	42425	6,16	15	4
CB153	<i>M. e.</i>	2493	↓	42	7,4	PGK1	phosphoglycerate kinase 1	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2235253.1	42425	6,28	13	4
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7385	↑	48	5,6	ENO1	enolase	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDH99047.1	46751	5,68	23	52
HAP 7	<i>M. e.</i>	599	↓	50	4,4	ENO1	enolase	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDH99047.1	46751	5,68	28	10
CB153	<i>M. e.</i>	2380	↓	48	6,0	ENO1	enolase	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDH99047.1	46751	5,68	20	5
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	495	↑	50	5,6	ENO1	enolase	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_034299341.1	47229	5,71	60	20
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	517	↓	48	5,8	ENO1	enolase	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_034299341.1	47229	5,71	78	32
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	546	↑	47	5,5	ENO1	enolase	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_034299341.1	47229	5,71	43	11
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	828	↓	35	5,5	ENO1	enolase	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_034299341.1	47229	5,71	26	10
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	7190	↓	39	5,5	ENO1	enolase	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_034299341.1	47229	5,71	51	16

Complexe Pyruvate Deshydrogenase mitochondrial (PDH)													
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	abrev.	Nom	Espèce de criblage	Ref.	PM	pl	% cov.	pep.
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11085	↓	45	6,7	PDHA	PDH-E1 alpha	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2230682.1	42616	7,48	5	7
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7434	↓	46	6,0	PDHA	PDH-E1 alpha	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2230682.1	42616	7,48	14	7
CB153	<i>M. e.</i>	2464	↓	43	6,6	PDHA	PDH-E1 alpha	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2230682.1	42616	7,48	18	9
HAP 7	<i>M. e.</i>	670	↑	47	6,5	PDHA	PDH-E1 alpha	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2230682.1	42616	7,48	5	7
CB153	<i>M. e.</i>	2704	↓	29	5,4	PDHB	PDH-E1 beta	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2225215.1	39061	6,02	8	3
CB153	<i>M. e.</i>	2306	↓	55	5,3	DLAT	PDH-E2	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2233690.1	53587	8,13	5	2
HAP 7	<i>M. e.</i>	556	↑	53	6,2	DLD	PDH-E3	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021371000.1	53757	6,16	43	27

Malate Deshydrogenases													
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	abrev.	Nom	Espèce de criblage	Ref.	PM	pl	% cov.	pep.
STM21K	<i>M. e. p.</i>	2078	↑	33,1	5,8	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AAZ79367.1	36423	6,02	20	35
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7618	↑	33	5,9	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AAZ79367.1	36423	6,02	27	14
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11305	↓	37	6,9	MDH2	malate dehydrogenase, mitochondrial-like	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	EYC23434.1	20857	9,30	11	2
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11345	↓	34,64	6,0	MDH2	malate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Pomacea canaliculata</i>	XP_025089045.1	37080	8,69	7	6
HAP 7	<i>M. e.</i>	805	↓	34	6,3	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AAZ79367.1	36423	6,02	16	49
HAP 7	<i>M. e.</i>	817	↑	33	6,7	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>mytilus edulis</i>	CAG2203718.1	29262	5,49	70	33
HAP 7	<i>M. e.</i>	852	↑	31	5,0	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>mytilus edulis</i>	CAG2203718.1	29262	5,49	39	8
HAP 14	<i>M. e.</i>	1386	↑	33	6,0	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>mytilus edulis</i>	CAG2203718.1	29262	5,49	33	14
CB153	<i>M. e.</i>	2674	↓	31	6,8	MDH2	malate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2251097.1	34107	8,20	9	3
CB153	<i>M. e.</i>	2675	↓	31	6,6	MDH2	malate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2251097.1	34107	8,20	3	2
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1281	↓	24,33	6,4	MDH2	malate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Pomacea canaliculata</i>	XP_025089045.1	37080	8,69	24	6
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	811	↑	35,68	6,3	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>Mytilus californianus</i>	AAZ79368.1	36446	6,15	55	16
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1217	↑	27,07	4,7	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>Mytilus californianus</i>	AAZ79368.1	36446	6,15	37	10
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	830	↑	37,94	5,5	MDH2	malate dehydrogenase, mitochondrial-like	<i>Mercenaria mercenaria</i>	XP_045169151.1	31360	6,81	57	15

Complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale													
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	abrev.	Nom	Espèce de criblage	Ref.	PM	pl	% cov.	pep.
HAP 14	<i>M. e.</i>	677	↓	90	5,0	NDUFS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021377783.1	79141	5,28	33	20
HAP 7	<i>M. e.</i>	321	↑	79	5,3	NDUFS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_034309222.1	80532	5,84	5	6
HAP 7	<i>M. e.</i>	325	↑	79	5,3	NDUFS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021377783.1	79141	5,28	3	4
STM21K	<i>M. e. p.</i>	1578	↑	77,96	5,1	NDUFS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021377783.1	79141	5,28	33	12
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7964	↓	21	4,7	NDUFS8	NADH dehydrogenase Fe-S protein 8	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2246469.1	24093	5,42	13	5
HAP 14	<i>M. e.</i>	1590	↓	25	4,6	NDUFS8	NADH dehydrogenase Fe-S protein 9	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2246469.1	24093	5,42	13	5
HAP 14	<i>M. e.</i>	1164	↑	48	8,3	NDUFV1	NADH dehydrogenase flavoprotein 1	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011424780.1	51133	8,39	11	5
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7945	↑	22	5,8	NDUFV2	NADH dehydrogenase flavoprotein 2	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2226095.1	27380	8,55	31	8

.../...

Complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale													
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	abrev.	Nom	Espèce de criblage	Ref.	PM	pl	% cov.	pep.
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7287	↑	60	7,8	ATP5F1A	F1-ATPsynthase, alpha	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2243890.1	59632	8,71	9	4
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7351	↑	50	7,0	ATP5F1A	F1-ATPsynthase, alpha	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2243890.1	59632	8,71	43	30
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7369	↑	50	6,5	ATP5F1A	F1-ATPsynthase, alpha	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2243890.1	59632	8,71	37	19
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7995	↓	20	7,0	ATP5F1A	F1-ATPsynthase, alpha	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2243890.1	59632	8,71	15	11
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10976	↑	51	7,8	ATP5F1A	F1-ATPsynthase, alpha	<i>Pinctada fucata</i>	ABJ51956.1	59680	8,92	22	36
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11627	↓	27	7,2	ATP5F1A	F1-ATPsynthase, alpha	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2243890.1	59632	8,71	13	47
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11007	↓	50	4,9	ATP5F1B	F1-ATPsynthase, beta	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2217436.1	54840	5,23	35	14
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11078	↓	45	5,0	ATP5F1B	F1-ATPsynthase, beta	<i>Mytilus edulis</i>	AAT06148.1	46260	4,95	35	12
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11109	↓	44	5,0	ATP5F1B	F1-ATPsynthase, beta	<i>Mytilus edulis</i>	AAT06148.1	46260	4,95	56	80
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11381	↑	33	4,9	ATP5F1B	F1-ATPsynthase, beta	<i>Mytilus edulis</i>	AAT06148.1	46260	4,95	39	59
HAP 7	<i>M. e.</i>	584	↓	52	6,8	ATP5F1A	F1-ATPsynthase, alpha	<i>Pinctada fucata</i>	ABJ51956.1	59680	8,92	16	29
HAP 7	<i>M. e.</i>	592	↓	51	6,0	ATP5F1A	F1-ATPsynthase, alpha	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2243890.1	59632	8,71	50	44
HAP 7	<i>M. e.</i>	676	↑	46	5,0	ATP5F1B	F1-ATPsynthase, beta	<i>Mytilus edulis</i>	AAT06148.1	46260	4,95	53	16
HAP 7	<i>M. e.</i>	952	↑	23	5,0	ATP5F1D	F1-ATPsynthase, delta	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2191488.1	20040	5,01	40	14
HAP 14	<i>M. e.</i>	1120	↓	49	6,8	ATP5F1A	F1-ATPsynthase, alpha	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	VDI08218.1	59632	8,71	37	19
HAP 14	<i>M. e.</i>	1189	↑	46	4,9	ATP5F1B	F1-ATPsynthase, beta	<i>Mytilus edulis</i>	AAT06148.1	46260	4,95	53	28
CB153	<i>M. e.</i>	2357	↓	48	4,7	ATP5F1B	F1-ATPsynthase, beta	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2217436.1	54840	5,23	23	10
CB153	<i>M. e.</i>	2421	↑	45	4,8	ATP5F1B	F1-ATPsynthase, beta	<i>Mytilus edulis</i>	AAT06148.1	46260	4,95	53	16
CB153	<i>M. e.</i>	2909	↓	23	4,9	ATP5F1D	F1-ATPsynthase, delta	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2191488.1	20040	5,01	20	3
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	501	↓	51	5,1	ATP5F1B	F1-ATPsynthase, beta	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021356377.1	56320	5,14	76	25
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	14602	↓	44	5,1	ATP5F1B	F1-ATPsynthase, beta	<i>Pomacea canaliculata</i>	XP_025093356.1	63221	5,91	43	16
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1408	↓	13	4,6	ATP5F1D	F1-ATPsynthase, delta	<i>Haliotis discus discus</i>	ABO26646.1	18653	5,78	56	9
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	1105	↓	27	5,7	ATP5F1B	F1-ATPsynthase, beta	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021356377.1	56320	5,14	26	10
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	1339	↑	12	4,4	ATP5F1D	F1-ATPsynthase, delta	<i>Haliotis discus discus</i>	ABO26646.1	17724	5,02	74	14

phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP] (PEPCK)													
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	abrev.	Nom	Espèce de criblage	Ref.	PM	pl	% cov.	pep
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7196	↑	71	7,6	PCK1_2	PEPCK	<i>Crassostrea gigas</i>	CAJ28913.1	72276	6,51	5	19
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10815	↑	68	7,6	PCK1_2	PEPCK	<i>Crassostrea gigas</i>	CAJ28913.1	72276	6,51	5	19
HAP 7	<i>M. e.</i>	361	↓	71	6,9	PCK1_2	PEPCK	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	15	9
HAP 7	<i>M. e.</i>	373	↓	71	6,8	PCK1_2	PEPCK	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	47	45
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	276	↑	73	6,4	PCK1_2	PEPCK	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	41	25
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	644	↑	43	5,8	PCK1_2	PEPCK, partiel	<i>Crassostrea gigas</i>	CAJ28913.1	72276	6,51	21	12
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	694	↑	41	6,2	PCK1_2	PEPCK, partiel	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	30	15
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	752	↑	38	5,8	PCK1_2	PEPCK, partiel	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	23	11
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1184	↓	27	5,7	PCK1_2	PEPCK, partiel	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	22	11
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	319	↓	73	5,2	PCK1_2	PEPCK	<i>Crassostrea gigas</i>	CAJ28913.1	72276	6,51	24	21
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	318	↓	73	6,7	PCK1_2	PEPCK	<i>Lingula anatina</i>	XP_013418183.1	71234	6,37	57	35
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	81959	↑	68	6,6	PCK1_2	PEPCK	<i>Crassostrea gigas</i>	NP_001292222.1	71410	6,51	30	15
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	723	↑	42	5,8	PCK1_2	PEPCK, partiel	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	33	20
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	731	↑	41	5,9	PCK1_2	PEPCK, partiel	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	36	28

Arginine kinase													
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pl _{obs}	abrev.	Nom	Espèce de criblage	Ref.	PM	pl	% cov.	pep.
STM21K	<i>M. e. p.</i>	2016	↓	35	7,6	CKB	arginine kinase	<i>Mytilus coruscus</i>	AKS48144.1	42161	6,80	37	34
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7754	↓	28	7,5	CKB	arginine kinase	<i>Mytilus coruscus</i>	AKS48144.1	42162	6,80	8	10
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11402	↑	33	7,7	CKB	arginine kinase	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2203115.1	39737	6,77	8	4
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11526	↓	29	5,7	CKB	arginine kinase	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2203115.1	39737	6,77	18	8
HAP 7	<i>M. e.</i>	733	↑	40	8,0	CKB	arginine kinase	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2203115.1	39737	6,77	26	15
HAP 7	<i>M. e.</i>	773	↑	37	7,0	CKB	arginine kinase	<i>Mytilus coruscus</i>	AKS48144.1	42162	6,80	11	5
HAP 14	<i>M. e.</i>	1248	↑	42	5,4	CKB	arginine kinase	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2203115.1	39737	6,77	7	2
HAP 14	<i>M. e.</i>	1355	↓	34	7,5	CKB	arginine kinase	<i>Aplysia kurodai</i>	BAB41095.1	39645	6,77	7	2
HAP 14	<i>M. e.</i>	1376	↓	38	8,0	CKB	arginine kinase	<i>Conus novaeollandiae</i>	ADK73590.1	39404	6,34	3	4
CB153	<i>M. e.</i>	2472	↑	42	5,2	CKB	arginine kinase	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2203115.1	39737	6,77	7	2
CB153	<i>M. e.</i>	2632	↑	34	7,1	CKB	arginine kinase	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2203115.1	39737	6,77	42	17
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	641	↓	44	7,0	CKB	arginine kinase	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_034334413.1	42376	7,13	54	20

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e.p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r.*, *bugensis*) ; GeneC sa référence GeneCards ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs}. est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pl_{obs}. le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pl son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

La modification du métabolisme énergétique est l'un des premiers indicateurs d'un stress physiologique en lien avec des besoins en énergie accrus. L'ATP nécessaire au fonctionnement cellulaire peut être fourni par différentes voies métaboliques. Puiser dans le réservoir de molécules possédant un groupement phosphate avec une liaison de haute énergie, comme la créatine-phosphate chez les vertébrés ou l'arginine-phosphate chez les bivalves (CKB, figure 49), est la manière la plus rapide de fournir un supplément d'ATP, parallèlement à l'activation de la glycolyse cytosolique (ALDO, TPI, PGK1, ENO, figures 49 et 50). En mode aérobie, la glycolyse produit du pyruvate qui est utilisé dans la mitochondrie par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDHA, PDHB, DLAT, DLD, figure 49) pour former de l'acétyl-CoA, premier substrat du cycle de Krebs. Lors de ce cycle, les coenzymes réduits seront réoxydés par la chaîne respiratoire mitochondriale (NDUFS1, NDUFV1, NDUFV2, NDUFS8, ATP5F1A, ATP5F1B, ATP5F1D, figure 49) au cours des phosphorylations oxydatives qui aboutissent à la production d'ATP par l'ATP synthase.

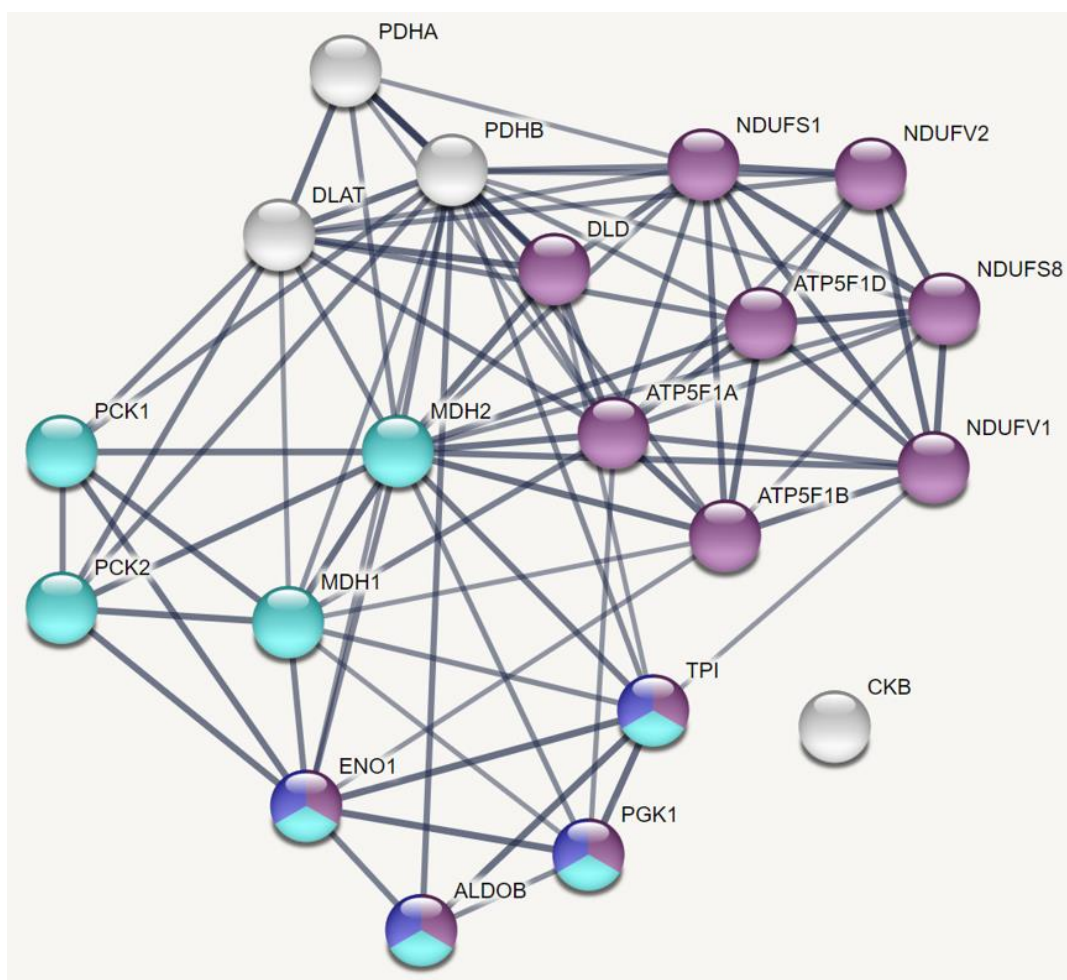


Figure 49 : String Interactions au sein de la catégorie METABOLISME ENERGETIQUE. En violet, protéines du processus biologique GO 0046034 ATP, processus métaboliques ; en bleu foncé, protéines du processus biologique GO 0061621, Glycolyse canonique ; en bleu turquoise, protéines du processus biologique GO 0006094, Néoglucogénèse. L'épaisseur des traits représente le niveau de confiance des interactions détectées par String (<https://string-db.org/Interactions>).

Les bivalves sont des organismes anaérobies facultatifs et mettent en place des mécanismes générant de l'ATP par des voies alternatives à la respiration. Quand les phosphorylations oxydatives sont limitées, du pyruvate excédentaire est produit par la glycolyse. Ce pyruvate peut être condensé avec l'arginine pour former de l'octopine, un métabolite qui sert de stock pour une récupération ultérieure du pyruvate. De plus, une dérivation métabolique (hypoxia branchpoint) est possible, dans laquelle le phosphoénolpyruvate issu de la glycolyse donne du fumarate à la suite de plusieurs réactions dans lesquelles interviennent les phosphoénolpyruvate carboxykinases, PEPCK, (PCK1/2, figures 49 et 50) et les malate déshydrogénases (MDH1/2, figures 49 et 50). De façon notable, le fumarate va être pris en charge par l'activité fumarate réductase du complexe II de la chaîne respiratoire, ce qui forme du succinate tout en faisant passer un proton dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie concourant ainsi à la production d'ATP par l'ATP synthase. Si en mode aérobie le succinate est utilisé pour former du fumarate (cycle de Krebs classique), en mode anaérobie, une voie alternative aboutit à la production de propionate et d'ATP (Larade et Storey 2002). Le couple PEPCK/MDH occupe une position stratégique dans la balance métabolique qui assure la production énergétique, c'est uniquement sur ces deux acteurs qu'un focus sera proposé dans la suite de ce mémoire.

V.2. Focus sur les malate déshydrogénases (EC 1.1.1.37, MDH)

V.2.1. Présentation des MDH

Les MDH existent sous forme cytosolique (MDH1) ou mitochondriale (MDH2). Les MDH catalysent la conversion de l'oxaloacétate en malate avec réduction du cofacteur NAD^+ en NADH. Elles participent à la navette malate/aspartate qui régénère, dans le cytosol, la forme oxydée du cofacteur NAD. La MDH2 est une enzyme du cycle de Krebs (TCA ou tricarboxylique) régulée de façon allostérique par le malate qui stimule l'activité de l'enzyme, l'oxaloacétate et le citrate qui sont inhibiteurs de sorte que, quand le cycle de Krebs est couplé aux phosphorylations oxydatives, l'enzyme fonctionne dans le sens malate vers oxaloacétate. L'oxaloacétate produit est le substrat, avec l'acétyl-Coenzyme A de la citrate synthase, première étape du cycle de Krebs. La réversibilité de l'activité enzymatique donne la possibilité de partir de l'oxaloacétate pour former du malate lorsque la charge énergétique est élevée ou quand la cellule fonctionne en anaérobie. Le malate formé dans la mitochondrie peut rejoindre le cytosol et être utilisé par la MDH1 pour former de l'oxaloacétate et alimenter en oxaloacétate la néoglucogenèse.

Les malates déshydrogénases sont des enzymes multimériques constituées de plusieurs sous-unités identiques souvent disposées en dimère ou en tétramère. Le poids moléculaire de chaque sous-unité est d'environ 30 à 40 kDa avec un dimère faisant en moyenne 70kDa (Minárik et coll. 2002). En général, les MDH sont stables sous forme de dimères, chaque sous-unité contenant deux domaines structurellement et fonctionnellement distincts : le domaine de liaison au NAD, occupant la moitié N-terminale de chaque molécule, le domaine C-terminal contenant un site de liaison au substrat et des acides aminés impliqués dans la catalyse. Le site actif de ces enzymes se trouve dans une fente entre les deux domaines (Hall, Levitt, et Banaszak 1992).

Des isoenzymes MDH existent et ont été particulièrement étudiées en phylogénie avec l'analyse par zymographie d'extraits tissulaires de vertébrés. Les propriétés enzymatiques et la mobilité électrophorétique de l'enzyme cytosolique ont peu changé au cours de l'évolution (Wieme 1974). Chez les bivalves, plusieurs loci de MDH cytosolique ont été décrits avec, classiquement, une enzyme majoritaire cytosolique et deux isoformes mitochondriales (Brodey et Bishop 1991). Chez *Crassostrea Virginica*, Ulrich et Marsh (2006) ont mis en évidence trois formes différentes de MDH, une de 45 kDa, une 38 kDa et une de 39 kDa.

V.2.2. Identifications des formes mitochondriales et cytosoliques

Chez plusieurs espèces de bivalves, les séquences MDH sont accessibles sur NCBI. Leur alignement permet d'établir des signatures propres aux isoformes MDH1 et MDH2 et de préciser l'identité des MDH de nos études (figure 51).

```

Mdh1Cgig      -----MGEPLKVLVTGAAGQIAYSLLYSVARGDVFGKDQPI 36
Mdh1Mgal      -----MAEPLRVLVTGAAGQIAYSLLYSVAKGDVFGPNQPI 36
Mdh1Dbug      -----MSAPLKVLVTGAAGQIAYSLSVFIAGKDVFGTNQPL 36
Mdh1Medu      -----MAEPLRVLVTGAAGQIAYSLLYSVAKGDVFGPNQPI 36
Mdh2Miyes     MFSRLARPAISKITQRTFTTSSK--DSAKVAVLGASGGIGQPLSLLKLTSPA-----IS 53
Mdh2Cgig      MFSRLARPSLAVCSSARNFSSSSQ--SNAKVAVLGASGGIGQPLSLLKLNHR-----VT 53
Mdh2Acal      MFSRLARPSQIIFVARKHFTSSK--NDSKVAVLGAGGIGQPLSLLKQSP-----IS 53
Mdh2Dbug      MFSRLARPASSIFN--RGFTTIS--NNANVAVLGAGGIGQPLSLLKMSPF-----VT 51
Mdh2Medu      MFSRLAKPSTVTFIVSRFCKSSQAWQSPKVAVLGAGGIGQPLSLLKNSAK-----IA 55
               . * * * * . * . * : .

Mdh1Cgig      ILVLLDIAPMMEVLNGVVMELTDCSL-PLLQQVIPSCDEMEAFKDVDVAMLVGAMPRREG 95
Mdh1Mgal      ILVLLDIQPLMLGVLEGVVMEMMDCAL-PLLREVIPSVNEMEAFKDVDVAMLVGAMPRREG 95
Mdh1Dbug      SLVLLDITPMMGVNLGVVMEMLKDCSF-PLLKEIIPDDYAVAFKDVDVAVLVGAMPRKEG 95
Mdh1Medu      ILVLLDIQPLMLGVLEGVVMEMMDCAL-PLLREVIPSVNEMEAFKDVDVAMLVGAMPRREG 95
Mdh2Miyes     QLSLYDIAHTPGV----AADLSHIETPAKVSGHMGPDDELDALEGADVLLIPAGVPRKPG 109
Mdh2Cgig      HLSLYDVMHTPGV----AADLSHISTKAKVTGHLGSDQLADAVRGADLVLIIPAGVPRKPG 109
Mdh2Acal      HLSLYDIAHTPGV----AADLSHIETRPKVTGHMGDEQLADCVKDADLVLIIPAGVPRKPG 109
Mdh2Dbug      RLSLYDIAHTPGV----AADLSHISSPAQVKGLGPNQLADCLKGAEVLLIPAGVPRKPG 107
Mdh2Medu      SLSLYDIAHTPGV----AADLSHIDTRAHVTGHLGPASLEACLTDA SVLLIPAGVPRKPG 111
               * * * : * . : . : : . . . . . : : * * : *

Mdh1Cgig      MERKDLLAANVKIFKSQQAIDKVAKKTIKVVVGNPANTNAYICKK-----YAPSIPPQ 150
Mdh1Mgal      MERKDLLAANVKIFKSMGNAIDTQAKKNIKVVVGNPANTNAYICKK-----YAPSINPA 150
Mdh1Dbug      MERKDLLAANVKIFKGQGEALDKHAKKNVVLVGNPANTNALICSK-----YAPSIPKQ 150
Mdh1Medu      MERKDLLAANVKIFKSMGNAIDTQAKKNIKVVVGNPANTNAYICKK-----YAPSINPA 150
Mdh2Miyes     MTRDDLFTNTNASIVLNLAACARVCPNAIL-GIITNPVNSTVPIAAEVYKMKMGVKGW-EK 167
Mdh2Cgig      MTRDDLFTNTNAGIVRDLCEVCAEVCDAIM-GIITNPVNSTVPIAAEVYKRKNFNFENKI 168
Mdh2Acal      MTRDDLFTNTNASIVANLIDSCAQNCPKAMI-GIITNPVNSTVPIASEVLKLRGVYD--KN 166
Mdh2Dbug      MTRDDLFTNTNASIVRDLVSAIADVCPKAMI-CIITNPVNSTVPIAAEVLKKKKVYD--PR 164
Mdh2Medu      MTRDDLFTNTNAGIVRDLVSAIGDFCPKAMI-CIITNPVNSTVPIAAEVLKKKKVYD--PR 168
               * * . : : * . . . . . : : * * . : .

Mdh1Cgig      NFTALTRLDQNRAQAQVAARLGV PNSAVKNCVWGNHSSSTQYPDLTYAVNVVGGKEVKAR 210
Mdh1Mgal      NFTALTRLDQNRAQAQIAAKLGVSNSVKNVCVWGNHSSSTQYPDVNQAVVDLNGKSMPVR 210
Mdh1Dbug      NFTAMTRLDQNRAQAQIADRLGCKVEDVQNVIIWGNHSATQYPDVRHATALVEGTTTPVQ 210
Mdh1Medu      NFTALTRLDQNRAQAQIAAKLGVSNSVKNVCVWGNHSSSTQYPDVNQAVVDLNGKSMPVR 210
Mdh2Miyes     RLFVGTTLDAVRANTFIAAARGVDVSKMGVPVIGGHSGVTIIPVISQATPTVSF---PME 224
Mdh2Cgig      NIFGVTSLDIVRANTFVSELKGLDVKNVPVIGGHSGVTIIPLLSQATPAVSF---PQE 225
Mdh2Acal      RVFGVTTLDVVRNSTFIAEAKGLDVNKFVFCPVIGGHSGITIVPVISQCSPSVSF---PQD 223
Mdh2Dbug      RLFVGTTLDVVRASTFIAEAKGLSVKSVNMPIIGGHSGVTIIPVISQCTPPVSF---PQD 221
Mdh2Medu      RLFVGTTLDIVRSNAFVAEAKELDVSKLNVPMGGHSG-----E 207
               . . : * * * : : : . : : : * : .

Mdh1Cgig      EAIKDDNWVKNDFVKTQVQRGAAVIKARK-----LSSAMSAAKAIVDHVHDWWFGVPEG 264
Mdh1Mgal      EAVKDDNWLNDFIKTVQVQRGAAVIKARK-----LSSAMSAAKAIVDHVRDWWNGVVDG 264
Mdh1Dbug      KAIKDDNWLNDFISTIQKRGAAVIAARK-----LSSAMSAAKASCDHIRDWWCGVPEG 264
Mdh1Medu      EAVKDDNWLNDFIKTVQVQRGAAVIKARK-----LSSAMSAAKAIVDHVRDWWNGVVDG 264
Mdh2Miyes     E-----RKALTERIQNAGTEVVEAKAGAGSATLSMAFAAARFA-DKLLLEALAGG-IE 274
Mdh2Cgig      E-----RKKLTERIQNAGTEVVEAKAGAGSATLSMAFAAARFA-YKMLDALNGA-DN 275
Mdh2Acal      Q-----RAAISVRIQNAGTEVVEAKAGAGSATLSMAYAAAEFA-NSLLEAMNGT-EG 273
Mdh2Dbug      V-----REKLTVRIQNAGTEVVEAKAGSGSATLSMAYAAARFA-ESLIEAIGGA-TG 271
Mdh2Medu      E-----RKKLSERIQNAGTEVVEAKAGAGSATLSMAYAAARFT-FSLLEAMAGG-EG 257
               . : : * : * : * : * * * : : . : : *

Mdh1Cgig      SMVSMVAPSDGSYGIEEGLVYSFPVRTKPDHTYEIIKDLPIDDFSREKMDITMKELVDEK 324
Mdh1Mgal      TYVSMVAPSDGSYNIEEGLIYSFPVRTKPDHTYEIVKGLTINDFSREKMDATEKELSEEK 324
Mdh1Dbug      RWVSMVAPSDGSYDVPEGLMYSFPVRTKADHTYEIVQGLEIDDFSQKMDLTAKLEEER 324

```

```

Mdh1Medu      TYVSMAPVPSDGSYNIEEGLIYSFPVRTKPDHTYEIVKGLTINDFSREKMDATEKELSEEK 324
Mdh2Miyes     QVECAYVKSDQ----TDATYFANPILLGKNGVEKNLGVGQMIEYEVGLVSAAMDELKSNI 330
Mdh2Cgig      RVECAYVRSTE----TPAAYFATPLLKGNGVEKNLGIPKTIEYEAQLIENAMPELQSNI 331
Mdh2Acal      KVQCAFVASDE----TDAKYFATPVLLGKNGVEKNLGIGHLLDYERKLVTAAMDELKSNI 329
Mdh2Dbug      KVECAYVESSE----TAAKYFATPILLGRHGVEETNLGMGKLIEYERKLVDAAPELLANI 327
Mdh2Medu      QVECAYVQSEE----TDAAFFSTPLLKGNGVEKNLGRGKLIDYEMQLLDAAMPPELLKNI 313
               .  *  *           .  ::  *:           .  .  :           ::.  :  :  **  :

Mdh1Cgig      NMAMSACQD----333
Mdh1Mgal      NMALSVCES----333
Mdh1dbug      ATALEVCSE----333
MDH1Medu      NMALSVCES----333
Mdh2Miyes     KKGEDFVAKNWS-342
Mdh2Cgig      KKGIEFMSK----340
Mdh2Acal      EKGEFVAKQFKK342
Mdh2Dbug      KKGEEFVKKS---337
Mdh2Medu      QAGVDFVNKS---323
               .  .  .

```

Figure 51 : Alignement par ClustalOmega de séquences peptidiques MDH1 et 2 de mollusques bivalves. Pour MDH1 : Cgig, *Crassostrea gigas* ; Mgal, *M. galloprovincialis* ; Dbug, *D.r. bugensis* ; Medu, *M. edulis*. Pour MDH2 : Miyes, *Mizuhopecten yessoensis* ; Cgig, *Crassostrea gigas* ; Acal, ; Dbug, *D.r. bugensis* ; Medu, *M. edulis*. Légende : "*", résidus conservés / ":", résidus partageant les mêmes propriétés physicochimiques / ".", résidus présentant une similarité.

La séquence mitochondriale compte 10 acides aminés supplémentaires avec un total de 340 résidus en moyenne. Sur l'ensemble de la séquence, les MDH cytosoliques de bivalves présentent une forte identité (au moins 70%). De même, les séquences MDH mitochondriales sont très proches (identité d'au moins 68%). En revanche, il n'y a que 22% d'identité en moyenne entre les MDH1 et MDH2 pour les séquences de bivalves testées. Cependant, des domaines semblables apparaissent au long des séquences avec des zones de forte identité entre les deux isoformes pouvant correspondre aux interfaces de dimérisation entre homodimères.

En conclusion, l'analyse des spectres de masse permet une bonne discrimination des formes cytosoliques et mitochondriales, à condition que le recouvrement soit suffisant.

V.2.3. Analyse des variations observées

Les modifications d'abondance des malate déshydrogénases sont rappelées dans le tableau 23 ci-dessous.

Tableau 23 : Occurrences DAP malates déshydrogénases MDH (extrait du tableau 22)

Malate Deshydrogenases													
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pI _{obs}	abrev.	Nom	Espèce de criblage	Ref.	PM	pI	% cov.	pep.
STM21K	<i>M. e. p.</i>	2078	↑	33	5,8	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AAZ79367.1	36423	6,02	20	35
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7618	↑	33	5,9	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AAZ79367.1	36423	6,02	27	14
HAP 7	<i>M. e.</i>	805	↓	34	6,3	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	AAZ79367.1	36423	6,02	16	49
HAP 7	<i>M. e.</i>	817	↑	33	6,7	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>mytilus edulis</i>	CAG2203718.1	29262	5,49	70	33
HAP 7	<i>M. e.</i>	852	↑	31	5,0	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>mytilus edulis</i>	CAG2203718.1	29262	5,49	39	8
HAP 14	<i>M. e.</i>	1386	↑	33	6,0	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>mytilus edulis</i>	CAG2203718.1	29262	5,49	33	14
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	811	↑	36	6,3	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>Mytilus californianus</i>	AAZ79368.1	36446	6,15	55	16
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1217	↑	27	4,7	MDH1	malate dehydrogenase, cytosolic	<i>Mytilus californianus</i>	AAZ79368.1	36446	6,15	37	10
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11345	↓	35	6,0	MDH2	malate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Pomacea canaliculata</i>	XP_025089045.1	37080	8,69	7	6
CAN3LH	<i>M. e.</i>	11305	↓	37	6,9	MDH2	malate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	EYC23434.1	20857	9,30	11	2
CB153	<i>M. e.</i>	2674	↓	31	6,8	MDH2	malate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2251097.1	34107	8,20	9	3
CB153	<i>M. e.</i>	2675	↓	31	6,6	MDH2	malate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Mytilus edulis</i>	CAG2251097.1	34107	8,20	3	2
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1281	↓	24	6,4	MDH2	malate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Pomacea canaliculata</i>	XP_025089045.1	37080	8,69	24	6
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	830	↑	38	5,5	MDH2	malate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Mercenaria mercenaria</i>	XP_045169151.1	31360	6,81	57	15

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e.p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r.*, *bugensis*) ; GeneC sa référence GeneCards ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs.} est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pI_{obs.} le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pI son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

Les variations des malate déshydrogénases rendent compte de plusieurs éléments. Tout d'abord, les résultats montrent la présence de plusieurs isoformes MDH en cohérence avec l'existence d'isozymes déjà décrite chez les bivalves. Si on considère le sens des variations, l'abondance de la MDH cytosolique est presque exclusivement augmentée, à l'exception du spot 805 de l'étude HAP7 qui est une protéoforme localisée sur les gels à proximité de la protéoforme majeure, avec un poids moléculaire légèrement plus élevé. En ce qui concerne la MDH mitochondriale, son abondance est réduite dans toutes les expériences, à l'exception du spot 830 chez *D. polymorpha*.

V.2.4. Confrontation avec la littérature

Dans le genre *Mytilus*, l'activité de la MDH est corrélée de manière significative à celle du cycle de Krebs (Dahlhoff, Stillman, et Menge 2002). De plus, la malate déshydrogénase cytosolique (MDH1) est considéré comme un indicateur de la capacité métabolique de par son rôle important dans le métabolisme anaérobie (Dahlhoff, Stillman, et Menge 2002 ; Ulrich et Marsh 2006).

L'activité des MDH fait déjà l'objet de suivi dans des études environnementales. Ainsi, lors d'une expérimentation multi-stress (jeûne, pression de prédation, stress thermique), Torossian et coll. (2020) ont mis en évidence une variation de l'activité MDH1 des moules, indépendante de la

température mais corrélée à la présence des prédateurs, et dépendante de l'état nutritionnel. Lors d'expériences d'émersion de moules *Mytilus galloprovincialis*, (Collins et coll. 2020) ont mesuré une augmentation de l'activité totale MDH pendant la phase aérienne, probablement liée à une hypoxie. Dans des expériences de chocs thermiques réalisées sur les 3 espèces, *M. edulis*, *M. trossulus* et *M. galloprovincialis*, Tomanek et Zuzow (2010) ont relevé sur des protéomes branchiaux une diminution de la MDH1 à l'une des températures de les plus élevées, mais uniquement chez *Mytilus galloprovincialis*. Les auteurs émettent l'hypothèse que la diminution observée est une preuve d'une diminution du métabolisme en réponse au stress thermique et prime sur la production anaérobie d'ATP. Par ailleurs, ils avancent que la plus faible abondance de la MDH1 peut indiquer que la navette malate-aspartate est réduite chez *M. galloprovincialis* à la température la plus élevée. En revanche, après exposition de moules juvéniles, *M. galloprovincialis*, à des particules d'arsenic, Yu et coll. (2016) ont observé une augmentation d'abondance de MDH1, signe d'une différence d'adaptation du métabolisme énergétique en réponse au type de stress et fonction du stade de développement de l'animal. Une autre étude sur des larve D de moules montre aussi une augmentation d'abondance de la MDH1 après exposition à l'arsenic et au cadmium, suggérant une possible stratégie de compensation dans la réponse observée (H. Wu et coll. 2016). Lors d'expositions de *M. galloprovincialis* à des nanoparticules d'argent, Duroudier et coll. (2019) mettent en évidence une diminution de MDH1 dans la glande digestive. Après exposition à un stress osmotique et à un stress thermique aérien, Vasquez, Martinez, et Tomanek (2020) ont observé, chez *M. trossulus*, une augmentation de l'abondance de MDH2 concomitamment à une diminution de l'abondance de MDH1. Les auteurs proposent qu'un mécanisme de compensation entre les deux isoformes soit mis en place en réponse au stress.

Les résultats obtenus au cours de ce travail amènent des éléments supplémentaires qui confirment l'intérêt de l'étude des MDH en biosurveillance, que ce soit par les mesures d'activité ou le suivi quantitatif. De plus, il serait pertinent de systématiquement discriminer les formes mitochondriales et cytosoliques qui peuvent présenter des variations d'abondance contraires.

V.3. Focus sur les phosphoénolpyruvate carboxykinases (EC 4.1.1.32, PEPCK)

V.3.1. Présentation des PEPCK

Les phosphoénolpyruvate carboxykinases sont hautement conservées parmi les métazoaires (50% d'identité entre *H. sapiens* et *Gallus gallus*). Elles présentent couramment deux isoformes, une

cytosolique (PEPCK 1), l'autre mitochondriale (PEPCK2). Chez les bivalves, les deux isoformes ne sont pas distinctes dans les bases de données.

Il existe trois voies métaboliques principales dans lesquelles la PEPCK joue un rôle clé. Ce sont des voies liées à la cataplérose. Il s'agit de la néoglucogénèse, de la néoglycérone et de la synthèse de la sérine. En tant qu'enzyme de la néoglucogénèse, la PEPCK catalyse, dans le cytosol, la transformation GTP dépendante de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate par décarboxylation phosphorylante. Dans la mitochondrie, le sens de cette réaction est inversé. Les réactions enzymatiques sont resituées en figure 52.

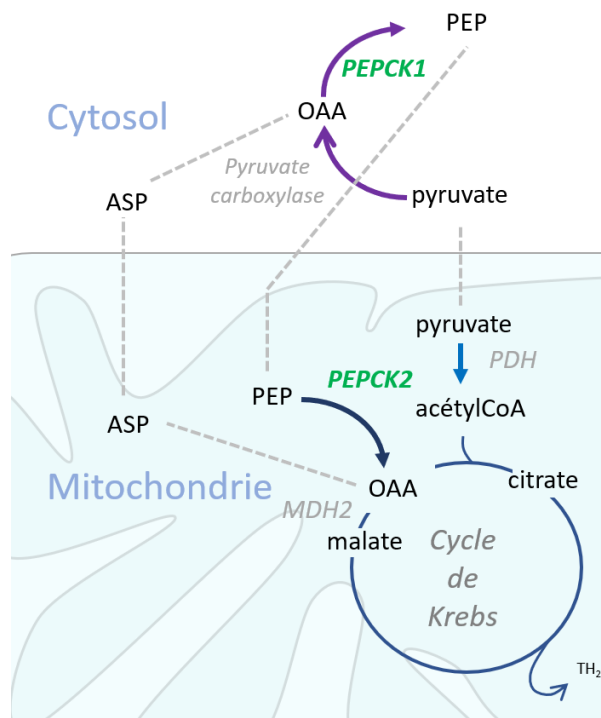


Figure 52 : Focus sur les phosphoénolpyruvate carboxykinases (extrait de la figure 50).

La PEPCK est composée d'un domaine de liaison à un métal divalent (en général Mn^{2+}) essentiel pour son activité catalytique, un domaine de liaison au GTP et un domaine de liaison au substrat, tous sont enfouis au sein du site actif de la protéine (Carlson et Holyoak 2009). Chez l'Homme, la PEPCK1 est une protéine d'environ 69 kDa, principalement exprimée dans le foie, les reins et les tissus adipeux avec un rôle majeur dans la néoglucogénèse à partir de l'oxaloacétate cytosolique. La PEPCK2 humaine est une protéine mitochondriale d'environ 71 kDa. Elle est impliquée dans la néoglucogénèse à partir du lactate et est présente dans une variété de tissus non néoglucogéniques, y compris le pancréas, le cerveau, les leucocytes, le cœur ou les neurones.

V.3.2. Identification de la PEPCK

Un alignement des séquences PEPCK a été réalisé entre plusieurs espèces de bivalves. L'alignement montre une conservation de 68% à 93% entre les espèces (figure 53).

PEPCKMgal	MSDNKAGENTS SVFSPEKTQYYEVHNIVVPHIGPVPIAKGDFHKLPPKKVQKFIKWVDICA	60
PEPCKMyes	-----MFESYQEEVLEVHEIVVPHLGLTLPILKGDFNLLGEKVKKFIGKYVQVCK	49
PEPCKMcor	MSDNKAAESTSVFSPEKTQYYEVHNIVVPHIGPVPIAKGDFHKLPPKKVQKFIKWVDICA	60
PEPCKDpol	MSKT--RHQEEIEEEENLFYEVHEVVVRKLGHVPIAKGDFHYLPKKVQRYVAKWVQICK	57
PEPCKDbug	MSKT--RHQEDMEEENLFYEVHEVVVHRLGHVPIAKGDFHYLPKNVQRYIAKWVQICK	57
	:. : ***: ** : * : ** : * : * : * : * : *	
PEPCKMgal	PRALYICDGSKEESDEIIHKLVERGVLTTELKKYENCFLCRTDPADVARVEAKTWISTEHEK	120
PEPCKMyes	PRALYICDGTQPEADEVTQKLVVERGTLTQLTKYENCWLCRTDPADVARVESKTIWIVTEDK	109
PEPCKMcor	PRALYICDGSKAESDEIIHKLVERGVLTTELKKYENCFLCRTDPADVARVEAKTWISTEEK	120
PEPCKDpol	PRAIYICDGSQDEATEVIHKLLEERGMLHKLKKYQDNYIVRTDPADVARVESKTIWMCTEQK	117
PEPCKDbug	PRGIYIADGSEDEATEIIHKLLEERGMLHKLKKYQNNYIVRTDPADVARVESKTIWMCTQEK	117
	*.:**.*.: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
PEPCKMgal	YDTPVPHVREGVKGILGQWIAPPDMEKEMNDRYPGCMKGRMTMFVIPFSMGPIGGPISKIGI	180
PEPCKMyes	YKTPVPHVREGVKGILGQWQSPGMEKEMSTRIPGCMAGRTMYVIPFSMGPIGGPISKIGV	169
PEPCKMcor	YDTPVPHVREGVKGILGQWISPEMEKEMNDRYPGCMKGRMTMFVIPFSMGPIGGPISKIGI	180
PEPCKDpol	YDTPVPHVQPGVVGILGKWISPEAAEH-LENYDGCMAGRMLYVIPFSMGPIGSPISKIGV	176
PEPCKDbug	YDTPVPHVQPGVLGILGKWISPEEAQTN-LDLYEGCMAGRMVYVIPFSMGPIGSPISKIGV	176
	*.*****: ** *****: * : * : * : * : * : * : * : * : *	
PEPCKMgal	QLTDSNYVLLCMNIMTRVSPKVWETL--GDGEFVKCIHSVGCPRPVERKVVNHWPNCNPER	238
PEPCKMyes	QLTDSNYVLLCMRIMTRVHHKIWEHI--GNDDFVRCVHSMGCPRPVQRKVTNHWPNCNPER	227
PEPCKMcor	QLTDSNYVLLCMNIMTRVSPKVWETL--GDGEFVKCIHSVGCPRPVTRKVVNHWPNCNPER	238
PEPCKDpol	ELTDSNYVLLCMRVMARVSNVDVWHFLREGDGEFVRCVHSMGCPRPVQRKTINHWPCNPEK	236
PEPCKDbug	EITDSNYVLLCMRVMARVSPDVWHFLREGNGEFVRCVHSMGCPRPSQRKTINHWPCNPEK	236
	:*****.*.:**.* : * : * : * : * : * : * : * : *	
PEPCKMgal	IMIAHRPTEREIMSYSGSYGGNSLLGKKCFALRIASVIARDEGWLAEHMLIMGLKNDKTG	298
PEPCKMyes	IMIAHYPKDKLICSYSGSYGGNSLLGKKCFALRIASTMARDEGWLAEHMLIMGLT-DKSG	286
PEPCKMcor	IMIAHRPTEREIMSYSGSYGGNSLLGKKCFALRIASVIARDEGWLAEHMLIMGLKNDKTG	298
PEPCKDpol	VFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTG	296
PEPCKDbug	VFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTG	296
	:*.* * : * :*****:*****. :*****:*****. :*	
PEPCKMgal	DEKFICAAFPSACGKTNLAMLQPSVPGYTVRVVGDDIAWLKFDKEGTLRAINPEAGFFGV	358
PEPCKMyes	KEVFVAAAFPSACGKTNLAMLTPSIPGYKVRVCGDDIAWLKFDSEGLRAINPENGFFGV	346
PEPCKMcor	EEKFICAAFPSACGKTNLAMLQPSVPGYTVRVVGDDIAWLKFDKEGTLRAINPEAGFFGV	358
PEPCKDpol	KETFLAAAFPSACGKTNMAMLTPSIPDYTVRCVVGDDIAWMRFDKDGVVLHGINPEAGFFGV	356
PEPCKDbug	KETFVAAAFPSACGKTNMAMLTPSIPDYTVRCVVGDDIAWMRFDKDGVVLHGINPEAGFFGV	356
	. * :.*****:*** :*.*.* *****:*. :*. :*. :*. :*	
PEPCKMgal	APGTNFKTNPNAMKTFQKNSIFTNVAETADGGFYWEGMEDEV-DKNMMITTWLNKKWQIG	417
PEPCKMyes	APGTNAKTNSNAMKSFQKNSIFTNVGMTRDGGFYWEGMEDEVEDKNIGITTWLNKWHIG	406
PEPCKMcor	APGTNFKTNPNAMKTFQKNSIFTNVAETADGGFYWEGMEDEV-DKNMMITTWLNKKWQIG	417
PEPCKDpol	CPGTNMKTNPAMLTCKMNSIFTNVAETADGGFFWEGLEDET-PHVTITDWLGNNWRRG	415
PEPCKDbug	CPGTNMKTNPAMLTCTMNSIFTNVAETADGGFFWEGLEDET-PHVTITDWLGQNWRRG	415
	.**** ** * : .*****. * *****:***:***.: : * * *.:* : *	
PEPCKMgal	APGKAAHPNSRFTAPASQCPNIHPDWEKPEGVPISAIIFGGRRPTGVPLVFETFSWQHGV	477
PEPCKMyes	DPGKAAHPNSRFTCPASQCPIIHPKWAEPEGVPISAIIFGGRRPTGVPLVFETFSWEHGV	466
PEPCKMcor	APGKAAHPNSRFTAPASQCPNIHPDWEKPEGVPISAIIFGGRRPTGVPLVFETFSWQHGV	477
PEPCKDpol	QPGKAAHPNSRFTCPAGQCPIIHPKWEDKKGVPISAFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWRHGV	475
PEPCKDbug	QPSKAAHPNSRFTCPAKQCPIIHPKWEDKKGVPISAFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWKHGV	475
	*.*****.* ** * * :*****:*****:*. :*. :*. :*	

PEPCKMgal	SVGACVKSEATAAAEFKGMIMHDPAMRPFMGYNFGNYLKHWLELEAKPHKVPKIFHVN	537			
PEPCKMyes	MVGSCVKSETTAAAEHTGKNIMHDPAMRPFMGYNFGHYLQHWLDLNKAPHKMPKIFHVN	526			
PEPCKMcor	SVGACVKSEATAAAEFKGMIMHDPAMRPFMGYNFGNYLKHWLDLEAKPHKVPKIFHVN	537			
PEPCKDpol	MIGATVKSEATAAAEFAGKSIHDPAMRPF LGYNFGKYLDHWLSLEKPPHKLKPKIFHVN	535			
PEPCKDbug	MIGATVKSEATAAAEFAGKSIHDPAMRPF LGYNFGKYLDHWLSMDKAPHKLKPKIFHVN : *: ****:*****. ** *****:*****:*.***.: : ****:*****	535			
PEPCKMgal	WFRVDEEGEF LWPGFGDNIRVLDWVLRRCAGEEGIAEKTPVGYPKKESFNLTNLGDLKW	597			
PEPCKMyes	WFRVGERGQFLWPGFGDNIRVLDWIVRRRCAGDESI AVRSPIGFLPKQGHNLVDGIEDFNW	586			
PEPCKMcor	WFRVDEEGEF LWPGFGDNIRVLDWVLRRCAGEEGIAEKTPVGYPKKESFNLTNLGDLKW	597			
PEPCKDpol	WFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRCEGDDSI AIKSPIGYLPKKG SINMDGLGKINW	595			
PEPCKDbug	WFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRCEGDDSI MIKSPIGYLPKKG SINMDGLGKINW ****. *. *: *****:*****:*** *: : * : *: *: *: : * : : : *	595			
PEPCKMgal	DELFSIPKYYWLDDIRESKRFLDQVGTDPVQVIWDELDEQEKRRLDLL-----	646			
PEPCKMyes	NELFSLPKHYWSDDARESRRFLDQVGQDVPQEIWNQLNAQQTRIEKDL-----	635			
PEPCKMcor	DELFSIPKYYWLDDIRESKRFLDQVGTDPVQVIWDELDEQEKRRLDLL-----	646			
PEPCKDpol	EELFSLPKHYWTS DIEENIRFLDLQVGEDLPQAIRDELAVQKKRIEELFADDGK	646			
PEPCKDbug	DELFSLPKHYWESDIEENIRFLDLQVGEDI PKAIREELAAQKKRIDEELFAEDGK :****:*. *: * . * . * : * : * : * : * : * : * : *	650			
1: PEPCKMgal	100.00	75.08	97.99	69.47	68.22
4: PEPCKDpol	69.47	68.88	69.78	100.00	93.19
5: PEPCKDbug	68.22	67.77	68.69	93.19	100.00

Figure 53 : Alignement par ClustalOmega de séquences peptidiques PEPCK de mollusques bivalves. Mgal, *M. galloprovincialis* ; Miyes, *Mizuhopecten yessoensis* ; Mcor, *M. coruscus* ; Dpol, *D. polymorpha* ; Dbug, *D. bugensis* ; Légende : "*", résidus conservés / ":", résidus partageant les mêmes propriétés physicochimiques / ".", résidus présentant une similarité.

Les différences concernent surtout les parties N-terminales et C-terminales. La zone cœur de la PEPCK, correspondant au domaine de liaison au GTP, est la zone la plus conservée. Une étude en cristallographie montre que cette partie centrale est enfouie lorsque la PEPCK n'est pas lié à des ligands et, de ce fait, difficile à atteindre par des protéases (Carlson et Holyoak 2009).

L'alignement des séquences de PEPCK entre les deux espèces de dreissène montre une très bonne conservation de la protéine avec une identité de 93% (figure 54).

Dp_Pepck 30336	MSKTRHQEEIEEEENLFYEVHEVVVRKLGHVPIAKGDFHYLPKKVQRYVAKWVQICKPRA	60
Db_Pepck 91669	MSKTRHQEDMEEENLFYEVHEVVVRLGHVPIAKGDFHYLPKNVQRYIAKWVQICKPRG *****.:*****:*****:*****:*****.	60
Dp_Pepck 30336	IYICDGSQDEATEVIHKLEERGMLHKLKKYQDNYIVRTDPADVARVESKTWMCTEQKYDT	120
Db_Pepck 91669	IYIADGSEDEATEI I HKLEERGMLHKLKKYQNNYIVRTDPADVARVESKTWMCTQEKYDT ***.***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****.	120
Dp_Pepck 30336	VPHVQPGVVGILGK WIS PDEAAEHL ENYD GCMAGRMLYVIPFSMGPIGSPLSKIGVELTD	180
Db_Pepck 91669	VPHVQPGVLGILGK WIS PEEAQ TNLD LYEGCMAGRM MYVIPFSMGPIGSPLSKIGVEITD *****:*****:*** :*: *****:*****:*****:*****:***	180
Dp_Pepck 30336	SNYVLLCMRVMAR V SNDV WHFL REGDGEFVRCLHSMGCPRPVQRKTINHWPCNPEKVF	240
Db_Pepck 91669	SNYVLLCMRVMAR V SPDV WHFL REGNGEFVRCLHSMGCPRPSQRKTINHWPCNPEKVF ***** *****:***** *****	240
Dp_Pepck 30336	HFPDKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEK TG KET	300
Db_Pepck 91669	HFPDKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEK TK KET ***** *****	300
Dp_Pepck 30336	LAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGV LHGINPEAGFFGVC	360
Db_Pepck 91669	VAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGV LHGINPEAGFFGVC :*****	360

```

Dp_Pepck|30336 NMKTNPNAMLTTCMKNSIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGNWRRGQPGKA 420
Db_Pepck|91669 NMKTNPAMLTTCMTNSIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGNWRRGQPSKA 420
*****.*****:*****.
Dp_Pepck|30336 AHPNSRFTCPAGQCPPIHPKWEDDKGVPISAFIFGRRPTGVPLVYEAFSWRHGVMIAT 480
Db_Pepck|91669 AHPNSRFTCPAKQCPPIHPKWEDDKGVPISAFIFGRRPTGVPLVYEAFSWKHGVMIAT 480
***** *****:*****
Dp_Pepck|30336 VKSEATAAAEFAGKSIHMDPMAMRPFLGYNFGKYLHWLSLEKPPHKLPIFHVNWFRVD 540
Db_Pepck|91669 VKSEATAAAEFAGKSIHMDPMAMRPFLGYNFGKYLHWLSMDKAPHKLPIFHVNWFRVD 540
*****:*****
Dp_Pepck|30336 EEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRCEGDDSIKSPIGYLPKKSINMDGLGKINWEELFS 600
Db_Pepck|91669 EEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRCEGDDSIMKSPIGYLPKKSINMDGLGKINWEELFS 600
*****:*****
Dp_Pepck|30336 LPKHYWTSIEENIRFLDLQVGEDLPQAIRDELAVQKKRIEELFADDGK 650
Db_Pepck|91669 LPKHYWESDIEENIRFLDLQVGEDIPKAIREELAAQKKRIDEELFAEDGK 650
*****:*****
1: Dp_Pepck30336 100.00 93.19
2: Db_Pepck91669 93.19 100.00

```

Figure 54 : Alignement sous ClustalOmega des séquences peptidiques PEPCK chez *D. polymorpha* (Dp) et *D. r. bugensis* (Db). Les peptides tryptiques spécifiques d'une espèce sont colorés en bleu pour *D. polymorpha* et en rouge pour *D. r. bugensis*. Légende : "*", résidus conservés / ":", résidus partageant les mêmes propriétés physicochimiques / ".", résidus présentant une similarité.

Sur cet alignement, on remarque que, malgré les similitudes entre les séquences PEPCK, certains résidus sont caractéristiques d'une seule espèce. Une question annexe se pose quant à une application potentielle en marqueur de discrimination des 2 dreissenés. Sur l'alignement précédent, les peptides tryptiques spécifiques sont colorés en bleu pour *Dreissena polymorpha* et en rouge pour *Dreissena rostriformis bugensis*. En tout, 5 peptides de plus de 5 acides aminés discriminent théoriquement les deux espèces. Ces peptides ont été reportés sur les résultats obtenus en X tandem, sur lesquels les peptides tryptiques détectés apparaissent en jaune et les peptides spécifiques en bleu et rouge, pour la moule zébrée et la moule quagga, respectivement (figures 55 et 56).

- *Dreissena polymorpha*

```

>CD7pol ID318(recouvrement sur la protéine entière ; 73690 kDa, pI 6,31)
MSKTRHQEEIEEEENLFYEVHEVVVRKLGHVPIAKGDFHYLPKKVQRYVAKWVQICKPRAIYICDGSQDEATEVI
HKLEERGMLHLKKYQDNYIVRTDPADVARVESKTWMCTEQKYDTVPHVQPGVVGILGKWISPDAAEHLENYDG
CMAGRMLYVIPFSMGPIGSPLSKIGVELTDSNYVLLCMRVMARVSNVDVWHFLREGDGEFVRCLHSMGCPRPVQRK
TINHWPENPEKVFIGHFDPKREICSFSGYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTGKETFL
LAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDDKGVLDHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPNAMLTTCMKNS
SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGNWRRGQPGKAAHPNSRFTCPAGQCPPIHPKWEDDKGVPIS
AFIFGRRPTGVPLVYEAFSWRHGVMIATVKSEATAAAEFAGKSIHMDPMAMRPFLGYNFGKYLHWLSLEKPP
HKLPIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRCEGDDSIKSPIGYLPKKSINMDGLGKINWEELFS
LPKHYWTSIEENIRFLDLQVGEDLPQAIRDELAVQKKRIEELFADDGK

```

```

>CD7pol ID319(recouvrement sur la protéine entière ; 73690 kDa, pI 6,31)
MSKTRHQEEIEEEENLFYEVHEVVVRKLGHVPIAKGDFHYLPKKVQRYVAKWVQICKPRAIYICDGSQDEATEVI
HKLEERGMLHLKKYQDNYIVRTDPADVARVESKTWMCTEQKYDTVPHVQPGVVGILGKWISPDAAEHLENYDG
CMAGRMLYVIPFSMGPIGSPLSKIGVELTDSNYVLLCMRVMARVSNVDVWHFLREGDGEFVRCLHSMGCPRPVQRK

```

TINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTGKETFLAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGV LHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPAMLTTCMKN SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGNNWRRGQPGKAAHPNSRFTCPAGQCPIIHPKWEDKKGVPIIS AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWRHGVMIGATVKSEATAAAEFAGKSIMHDPAMMRPFLGYNFGKYLDHWLSLEKPP HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRRCEGDDSIATKSPIGYLPKKGSINMDGLGKINWEELFSLPKHYWTS DIEENIRFLDLQVGEDLPQAIRDELAVQKKRIEEELFADDGK

>CD7pol 81959(recouvrement sur les derniers 621 résidus ; 66403 kDa et pI 5,98)

MSKTRHQEEIEEEENLFYEVHEVVVRKLGHVPIAKGDFHYLPKKVQRYVAKWVQICKPRAIYICDGSQDEATEVI HKLEERGMLHKLKKYQDNYIVRTDPADVARVESKTMCTEQKYDTVPHVQPGVVGILGKWISPDAAEHLENYDCMAGRMLYVIPFSMGPISPLSKIGVELTDSNYVLLCMRVMARVSNVWHFLREGDGEFVRCLHSMGCPRPVQRTINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTGKETFLAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGV LHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPAMLTTCMKN SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGNNWRRGQPGKAAHPNSRFTCPAGQCPIIHPKWEDKKGVPIIS AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWRHGVMIGATVKSEATAAAEFAGKSIMHDPAMMRPFLGYNFGKYLDHWLSLEKPP HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRRCEGDDSIATKSPIGYLPKKGSINMDGLGKINWEELFSLPKHYWTS DIEENIRFLDLQVGEDLPQAIRDELAVQKKRIEEELFADDGK

>CD7pol 723(recouvrement sur les derniers 381 résidus ; 42697 kDa et pI 5,62)

MSKTRHQEEIEEEENLFYEVHEVVVRKLGHVPIAKGDFHYLPKKVQRYVAKWVQICKPRAIYICDGSQDEATEVI HKLEERGMLHKLKKYQDNYIVRTDPADVARVESKTMCTEQKYDTVPHVQPGVVGILGKWISPDAAEHLENYDCMAGRMLYVIPFSMGPISPLSKIGVELTDSNYVLLCMRVMARVSNVWHFLREGDGEFVRCLHSMGCPRPVQRTINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTGKETFLAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGV LHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPAMLTTCMKN SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGNNWRRGQPGKAAHPNSRFTCPAGQCPIIHPKWEDKKGVPIIS AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWRHGVMIGATVKSEATAAAEFAGKSIMHDPAMMRPFLGYNFGKYLDHWLSLEKPP HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRRCEGDDSIATKSPIGYLPKKGSINMDGLGKINWEELFSLPKHYWTS DIEENIRFLDLQVGEDLPQAIRDELAVQKKRIEEELFADDGK

>CD7pol 731(recouvrement sur les derniers 381 résidus ; 42697 kDa et pI 5,62)

MSKTRHQEEIEEEENLFYEVHEVVVRKLGHVPIAKGDFHYLPKKVQRYVAKWVQICKPRAIYICDGSQDEATEVI HKLEERGMLHKLKKYQDNYIVRTDPADVARVESKTMCTEQKYDTVPHVQPGVVGILGKWISPDAAEHLENYDCMAGRMLYVIPFSMGPISPLSKIGVELTDSNYVLLCMRVMARVSNVWHFLREGDGEFVRCLHSMGCPRPVQRTINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTGKETFLAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGV LHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPAMLTTCMKN SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGNNWRRGQPGKAAHPNSRFTCPAGQCPIIHPKWEDKKGVPIIS AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWRHGVMIGATVKSEATAAAEFAGKSIMHDPAMMRPFLGYNFGKYLDHWLSLEKPP HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRRCEGDDSIATKSPIGYLPKKGSINMDGLGKINWEELFSLPKHYWTS DIEENIRFLDLQVGEDLPQAIRDELAVQKKRIEEELFADDGK

Figure 55 : Croisement des données d'identification et des peptides tryptiques spécifiques de *D. polymorpha*. En jaune, les peptides reconnus sous X!tandem, en bleu les peptides tryptiques spécifiques de cette espèce ; 5 spots 318, 319, 81959, 723 et 731.

- ***Dreissena rostriformis bugensis***

>CD7bug ID276 (recouvrement sur la protéine entière ; 73479 kDa, pI 6,31)

MSKTRHQEDMEEENLFYEVHEVVVRHRLGHVPIAKGDFHYLPKNVQRYIAKWVQICKPRGIYIADGSEDEATEI I HKLEERGMLHKLKKYQNNYIVRTDPADVARVESKTMCTQEKYDTVPHVQPGVLGILGKWISPEEAQTNLDLYEGCMAGRMMYVIPFSMGPISPLSKIGVEITDSNYVLLCMRVMARVSPDVWHFLREGDGEFVRCLHSMGCPRPSPQRKTINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTGKETFLVAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGV LHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPAMLTTCMTN SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGQNWRRGQPSKAAHPNSRFTCPAKQCPIIHPKWEDKKGVPIIS AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWKHGVMIGATVKSEATAAAEFAGKSIMHDPAMMRPFLGYNFGKYLDHWLSMDKAP HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRRCEGDDSIMIKSPIGYLPKKGSINMDGLGKINWDELFS LPKHYWESDIEENIRFLDLQVGEDIPKAIREELAAQKKRIDEELFAEDGK

>CD7bug ID644(recouvrement sur 295 résidus en deuxième moitié de protéine ; 32827 kDa et pI 6,84)

MSKTRHQEDMEEEEENLFYEVHEVVVHRLGHVPIAKGDFHYLPKNVQRYIAKWVQICKPRGIYIADGSEDEATEII
 HKLEERGMLHKLKKYQNNYIVRTDPADVARVESKTMCTQEKYDTPVHVQPGVLGILGKWISPEEAQTNLDLYEG
 CMAGRMMYVIPFSMGPIGSPLSKIGVEITDSNYVLLCMRVMARVSPDVWHFLREGNGEFVRLHSMGCPRPSQRK
 TINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTKK**ETF**
VAAAFPSACGKTNMAMLTPSIPDYTVR**CVGDDIAWMRF**DKDGV**LHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNP**NAMLT**TCMTN**
SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGQNWRRGQPSKAAHPNSR**FTCPAKQCP**IIHPKWEDKK**GVPIS**
AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWKHGVMIGATVKSEATAAAEFAGK**SIMHDP**MAMRPFLGYNFGKYLDHWLSMDKAP
 HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRR**CEGDDSIMIK**SPIGYLPKK**GSINMDGLGK**INWDELFS
 LPKHYWESDIEENIRFLDLQVGEDIPKAIREELAAQKKRIDEELFAEDGK

>CD7bug 694 (recouvrement sur 388 résidus en deuxième moitié de protéine ; 44896 kDa et pI 6,03)

MSKTRHQEDMEEEEENLFYEVHEVVVHRLGHVPIAKGDFHYLPKNVQRYIAKWVQICKPRGIYIADGSEDEATEII
 HKLEERGMLHKLKKYQNNYIVRTDPADVARVESKTMCTQEKYDTPVHVQPGVLGILGKWISPEEAQTNLDLYEG
 CMAGRMMYVIPFSMGPIGSPLSKIGVEITDSNYVLLCMRVMARVSPDVWHFLREGNGEFVRLHSMGCPRPSQRK
 TINHWPCNPEKVFIGHFDPKREIC**SFGSGYGGNSILGK**KCFALRIAGCIAR**DEGWLAEHMLIMGLTNEK**TKK**ETF**
VAAAFPSACGKTNMAMLTPSIPDYTVR**CVGDDIAWMRF**DKDGV**LHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNP**NAMLT**TCMTN**
SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGQNWRRGQPSKAAHPNSR**FTCPAKQCP**IIHPKWEDKK**GVPIS**
AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWKHGVMIGATVKSEATAAAEFAGK**SIMHDP**MAMRPFLGYNFGKYLDHWLSMDKAP
 HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRR**CEGDDSIMIK**SPIGYLPKK**GSINMDGLGK**INWDELFS
 LPKHYWESDIEENIRFLDLQVGEDIPKAIREELAAQKKRIDEELFAEDGK

>CD7bug ID 752 (recouvrement sur 348 résidus en deuxième moitié de protéine ; 39192 kDa et pI 5,73)

MSKTRHQEDMEEEEENLFYEVHEVVVHRLGHVPIAKGDFHYLPKNVQRYIAKWVQICKPRGIYIADGSEDEATEII
 HKLEERGMLHKLKKYQNNYIVRTDPADVARVESKTMCTQEKYDTPVHVQPGVLGILGKWISPEEAQTNLDLYEG
 CMAGRMMYVIPFSMGPIGSPLSKIGVEITDSNYVLLCMRVMARVSPDVWHFLREGNGEFVRLHSMGCPRPSQRK
 TINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTKKET**F**
VAAAFPSACGKTNMAMLTPSIPDYTVR**CVGDDIAWMRF**DKDGV**LHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNP**NAMLT**TCMTN**
SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGQNWRRGQPSKAAHPNSR**FTCPAKQCP**IIHPKWEDKK**GVPIS**
AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWKHGVMIGATVKSEATAAAEFAGK**SIMHDP**MAMRPFLGYNFGKYLDHWLSMDKAP
 HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRR**CEGDDSIMIK**SPIGYLPKK**GSINMDGLGK**INWDELFS
 LPKHYWESDIEENIRFLDLQVGEDIPKAIREELAAQKKRIDEELFAEDGK

>CD7bug 1184 (recouvrement sur les premiers 171 résidus ; 19759 kDa et pI 5,90)

MSKTR**HQEDMEEEEENLFYEVHEVVVHRL**GHVPIAKGDFHYLPK**NVQRYIAKWVQICKPR**GIYIADGSEDEATEII
HKLEERGMLHKLKKYQNNYIVRTDPADVARVESK**TWMCTQEKYDTPVHVQPGVLGILGKWISPEEAQTNLDLYEG**
CMAGRMMYVIPFSMGPIGSPLSKIGVEITDSNYVLLCMRVMARVSPDVWHFLREGNGEFVRLHSMGCPRPSQRK
 TINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTKKET**F**
VAAAFPSACGKTNMAMLTPSIPDYTVR**CVGDDIAWMRF**DKDGV**LHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNP**NAMLT**TCMTN**
SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGQNWRRGQPSKAAHPNSR**FTCPAKQCP**IIHPKWEDKK**GVPIS**
AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWKHGVMIGATVKSEATAAAEFAGK**SIMHDP**MAMRPFLGYNFGKYLDHWLSMDKAP
 HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRR**CEGDDSIMIK**SPIGYLPKK**GSINMDGLGK**INWDELFS
 LPKHYWESDIEENIRFLDLQVGEDIPKAIREELAAQKKRIDEELFAEDGK

Figure 56 : Croisement des données d'identification et des peptides tryptiques spécifiques de *D. r. bugensis*. En jaune, les peptides reconnus sous X!tandem, en rouge les peptides tryptiques spécifiques de cette espèce, 5 spots : 276, 644, 694, 752, 1184.

De façon intéressante, le peptide FLDLQVGEDLPQAIR est celui le plus retrouvé chez *D. polymorpha* et le peptide CEGDDSIMIK celui le plus retrouvé chez *D. r. bugensis*.

V.3.3. Analyse des variations des PEPCK

Les modifications d'abondance des phosphoénolpyruvate carboxykinases sont rappelées dans le tableau 24 ci-dessous.

Tableau 24 : Occurrences DAP phosphoénolpyruvate carboxykinases PEPCK (extrait du tableau 22)

phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP] (PEPCK)													
Etude	Espèce	ID	Var.	PM _{obs}	pI _{obs}	abrev.	Nom	Espèce de criblage	Ref.	PM	pI	% cov.	pep.
CAN3YP	<i>M. e.</i>	7196	↑	71	7,6	PCK1_2	PEPCK	<i>Crassostrea gigas</i>	CAJ28913.1	72276	6,51	5	19
CAN3LH	<i>M. e.</i>	10815	↑	68	7,6	PCK1_2	PEPCK	<i>Crassostrea gigas</i>	CAJ28913.1	72276	6,51	5	19
HAP 7	<i>M. e.</i>	361	↓	71	6,9	PCK1_2	PEPCK	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	15	9
HAP 7	<i>M. e.</i>	373	↓	71	6,8	PCK1_2	PEPCK	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	47	45
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	276	↑	73	6,4	PCK1_2	PEPCK	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	41	25
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	644	↑	43	5,8	PCK1_2	PEPCK, partiel	<i>Crassostrea gigas</i>	CAJ28913.1	72276	6,51	21	12
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	694	↑	41	6,2	PCK1_2	PEPCK, partiel	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	30	15
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	752	↑	38	5,8	PCK1_2	PEPCK, partiel	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	23	11
Cd7Bug	<i>D. r. b.</i>	1184	↓	27	5,7	PCK1_2	PEPCK, partiel	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	22	11
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	319	↓	73	5,2	PCK1_2	PEPCK	<i>Crassostrea gigas</i>	CAJ28913.1	72276	6,51	24	21
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	318	↓	73	6,7	PCK1_2	PEPCK	<i>Lingula anatina</i>	XP_013418183.1	71234	6,37	57	35
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	81959	↑	68	6,6	PCK1_2	PEPCK	<i>Crassostrea gigas</i>	NP_001292222.1	71410	6,51	30	15
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	723	↑	42	5,8	PCK1_2	PEPCK, partiel	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	33	20
Cd7Pol	<i>D. p.</i>	731	↑	41	5,9	PCK1_2	PEPCK, partiel	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	XP_021338859.1	71661	6,89	36	28

Légende : ID (colonne 3) correspond à la référence de la protéoforme dans l'étude concernée (colonne 1), l'espèce est indiquée en colonne 2 (*M. e.p.*, *M. edulis platensis*, *M. e. M.*, *edulis*, *D. p.*, *D. polymorpha* et *D. r. b.*, *D. r.*, *bugensis*) ; GeneC sa référence GeneCards ; var. représente le sens de variation d'abondance par rapport au témoin ; PM_{obs}. est le poids moléculaire observé (exprimé en Da), pI_{obs}. le point isoélectrique observé ; les colonnes suivantes donnent les indications en retour de criblage où Ref est la référence NCBI de la protéine, PM, son poids moléculaire en Da, pI son point isoélectrique ; % cov. est le pourcentage de recouvrement de la séquence et pep, le nombre de peptides uniques, après criblage.

De nombreux DAP ont été identifiées comme PEPCK et, de façon nette, la majorité des occurrences est rencontrée chez les dreissènes. Chez *Mytilus*, seules les études CAN3YP, CAN3LH et HAP7 montrent des variations de PEPCK, toutes correspondant à la forme entière de la protéine. Sur les gels, cette PEPCK présente une série de protéoformes de même PM et de pI proches, caractéristique de petites modifications post-traductionnelles qui pourraient être en lien avec l'état d'activation de l'enzyme. Dans le détail, des augmentations de l'abondance de PEPCK apparaissent dans les études CAN3YP et CAN3LH. A l'inverse, dans l'étude HAP7, deux protéoformes PEPCK sont diminuées, reste à savoir si ce sont des formes majeures actives ou inactives. Chez la dreissène, une apparition de protéoformes tronquées est relevée pour les deux espèces.

Dans le détail, chez la moule quagga, ces formes partielles sont de l'ordre de 40 kDa (ID 644, 694 et 752) et, augmentées, alors que la forme entière de poids moléculaire 73480 Da et de pI 6,61, présente une abondance diminuée. Une protéoforme de 27 kDa (ID 1184) est également moins abondante après exposition au cadmium.

Chez la moule zébrée, deux PEPCK entières (ID 319 et 318), de poids moléculaire 73690 Da et de pI proches, voient leur abondance diminuée, parallèlement à une augmentation de deux formes partielles (ID 723 et 731), respectivement de 42 kDa et 41 kDa. Une protéoforme de 68 kDa (ID 81959) est également plus abondante après exposition au cadmium.

Les spectres de masse correspondant aux spots variants chez les dreissènes montrent une bonne couverture sur les séquences PEPCK issues des banques de dreissène ce qui renseigne sur la zone conservée des protéoformes partielles (figures 57 et 58).

- **PEPCK *Dreissena polymorpha***

>CD7pol ID 318(recouvrement sur la protéine entière)

MSKTRHQQEIEEEENLFYEVHEVVVRKLGHVPIAKGDFHYLPKQVQRYVAKWVQICKPRAIYICDGSQDEATEVI
 HKLEERGMLHLKLYQDNYIVRTDPADVARVESKTWMCTEQKYDTPVPHVQPGVVGILGKWISPDAAEHLENYDG
 CMAGRMLYVIPFSMGPIGSPSLKIGVELTDSNYVLLCMRVMARVSNVWHFLREGDGEFVRCLHSMGCPRPVQQRK
 TINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTGKETF
 LAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGVHLHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPAMLTCKMN
 SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGNNWRRGQPGKAAHPNSRFTCPAGQCPIIHPKWEDKKGVPIIS
 AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWRHGVMIGATVKSEATAAAEFAGKSIMHDPAMMRPFLGYNFGKYLDHWLSLEKPP
 HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRCEGDDSIKSPIGYLPKKGSINMDGLGKINWEELFS
 LPKHYWTSIEENIRFLDLQVGEDLPQAIRDELAVQKKRIEEELFADDGK

>CD7pol ID 319(recouvrement sur la protéine entière)

MSKTRHQQEIEEEENLFYEVHEVVVRKLGHVPIAKGDFHYLPKQVQRYVAKWVQICKPRAIYICDGSQDEATEVI
 HKLEERGMLHLKLYQDNYIVRTDPADVARVESKTWMCTEQKYDTPVPHVQPGVVGILGKWISPDAAEHLENYDG
 CMAGRMLYVIPFSMGPIGSPSLKIGVELTDSNYVLLCMRVMARVSNVWHFLREGDGEFVRCLHSMGCPRPVQQRK
 TINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTGKETF
 LAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGVHLHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPAMLTCKMN
 SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGNNWRRGQPGKAAHPNSRFTCPAGQCPIIHPKWEDKKGVPIIS
 AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWRHGVMIGATVKSEATAAAEFAGKSIMHDPAMMRPFLGYNFGKYLDHWLSLEKPP
 HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRCEGDDSIKSPIGYLPKKGSINMDGLGKINWEELFS
 LPKHYWTSIEENIRFLDLQVGEDLPQAIRDELAVQKKRIEEELFADDGK

>CD7pol 81959(recouvrement sur les 621 résidus ; 69991 kDa et pI 6,52)

MSKTRHQQEIEEEENLFYEVHEVVVRKLGHVPIAKGDFHYLPKQVQRYVAKWVQICKPRAIYICDGSQDEATEVIHKLEERGMLHLKLYQDNYIVRTDP
 ADVARVESKTWMCTEQKYDTPVPHVQPGVVGILGKWISPDAAEHLENYDGCMAGRMLYVIPFSMGPIGSPSLKIG
 VELTDSNYVLLCMRVMARVSNVWHFLREGDGEFVRCLHSMGCPRPVQQRKTINHWPCNPEKVFIGHFDPKREIC
 FSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTGKETFLAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYT
 VRCVGDDIAWMRFDKDGVHLHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPAMLTCKMNSIFTNVAETADGGFFWEGLEDETD
 PHTITDWLGNNWRRGQPGKAAHPNSRFTCPAGQCPIIHPKWEDKKGVPIISAFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWRHG
 VMIGATVKSEATAAAEFAGKSIMHDPAMMRPFLGYNFGKYLDHWLSLEKPPHKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPG
 FGDNRVLDWIIRCEGDDSIKSPIGYLPKKGSINMDGLGKINWEELFSLPKHYWTSIEENIRFLDLQVGEDLP
 QAIRDELAVQKKRIEEELFADDGK

Protéines tronquées PEPCK chez *Dreissena polymorpha* :

>CD7pol ID 723(recouvrement sur les derniers 381 résidus ; 42697 kDa et pI 5,62)

MSKTRHQQEIEEEENLFYEVHEVVVRKLGHVPIAKGDFHYLPKQVQRYVAKWVQICKPRAIYICDGSQDEATEVI
 HKLEERGMLHLKLYQDNYIVRTDPADVARVESKTWMCTEQKYDTPVPHVQPGVVGILGKWISPDAAEHLENYDG
 CMAGRMLYVIPFSMGPIGSPSLKIGVELTDSNYVLLCMRVMARVSNVWHFLREGDGEFVRCLHSMGCPRPVQQRK
 TINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTGKETF
 LAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGVHLHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPAMLTCKMN
 SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGNNWRRGQPGKAAHPNSRFTCPAGQCPIIHPKWEDKKGVPIIS
 AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWRHGVMIGATVKSEATAAAEFAGKSIMHDPAMMRPFLGYNFGKYLDHWLSLEKPP
 HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRCEGDDSIKSPIGYLPKKGSINMDGLGKINWEELFS
 LPKHYWTSIEENIRFLDLQVGEDLPQAIRDELAVQKKRIEEELFADDGK

>CD7pol ID 731(recouvrement sur les derniers 381 résidus ; 42697 kDa et pI 5,62)

MSKTRHQQEIEEEENLFYEVHEVVVRKLGHVPIAKGDFHYLPKQVQRYVAKWVQICKPRAIYICDGSQDEATEVI
 HKLEERGMLHLKLYQDNYIVRTDPADVARVESKTWMCTEQKYDTPVPHVQPGVVGILGKWISPDAAEHLENYDG
 CMAGRMLYVIPFSMGPIGSPSLKIGVELTDSNYVLLCMRVMARVSNVWHFLREGDGEFVRCLHSMGCPRPVQQRK
 TINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGKKCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTGKETF
 LAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGVHLHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPAMLTCKMN
 SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGNNWRRGQPGKAAHPNSRFTCPAGQCPIIHPKWEDKKGVPIIS

AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWRHGVMIGATVKSEATAAAEFAGKSIMHDPMAMRPF LGYNFGKYLDHWLSLEKPP
 HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRRCGDDSIKSPIGYLPKKG SINMDGLGKINWDELF
 LPKHYWTS DIEENIRFLDLQVGEDLPQAIRDELAVQKKRIEELFAEDGK

Figure 57 : Couverture des séquences PEPCK chez la moule zébrée. En jaune, les peptides reconnus sous X!tandem ; protéines entières (319, 318 et 81959) et formes partielles (723 et 731).

- **PEPCK *Dreissena bugensis rostriformis***

>CD7bug ID276 (recouvrement sur la protéine entière ; 73479 kDa, pI 6,31)

MSKTRHQEDMEEEEENLFYEVHEVVVHRLGHVPIAKGDFHYLPKNVQRYIAKWVQICKPRGIYIADGSEDEATEII
 HKLEERGMLHKLKQNNYIVRTDPADVARVESKTMCTQEKYDTPVPHVQPGVLGILGKWISPEEAQTNLDLYEG
 CMAGRMMYVIPFSMGPIGSPSLKIGVEITDSNYVLLCMRVMARVSPDVWHFLREGNGEFVRLHSMGCPRPSQRK
 TINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGK KCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTKKETF
 VAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGV LHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPNAMLTCTMTN
 SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGQNWRRGQPSKAAHPNSRFTCPAKQCPIIHPKWEDKKGVPI
 AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWKHGVMIGATVKSEATAAAEFAGK SIMHDPMAMRPF LGYNFGKYLDHWLSMDKAP
 HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRRCGDDSIMIKSPIGYLPK KGSINMDGLGKINWDELF
 LPKHYWESDIEENIRFLDLQVGEDIPKAIREELAAQKKRIDEELFAEDGK

Protéines tronquées PEPCK chez *Dreissena rostriformis bugensis*

>CD7bug ID644 (recouvrement sur 295 résidus en 2ème partie ; 32827 kDa et pI 6,84)

MSKTRHQEDMEEEEENLFYEVHEVVVHRLGHVPIAKGDFHYLPKNVQRYIAKWVQICKPRGIYIADGSEDEATEII
 HKLEERGMLHKLKQNNYIVRTDPADVARVESKTMCTQEKYDTPVPHVQPGVLGILGKWISPEEAQTNLDLYEG
 CMAGRMMYVIPFSMGPIGSPSLKIGVEITDSNYVLLCMRVMARVSPDVWHFLREGNGEFVRLHSMGCPRPSQRK
 TINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGK KCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTKKETF
 VAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGV LHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPNAMLTCTMTN
 SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGQNWRRGQPSKAAHPNSRFTCPAKQCPIIHPKWEDKKGVPI
 AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWKHGVMIGATVKSEATAAAEFAGK SIMHDPMAMRPF LGYNFGKYLDHWLSMDKAP
 HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRRCGDDSIMIKSPIGYLPK KGSINMDGLGKINWDELF
 LPKHYWESDIEENIRFLDLQVGEDIPKAIREELAAQKKRIDEELFAEDGK

>CD7bug 694 (recouvrement sur 388 résidus en 2ème partie ; 44896 kDa et pI 6,03)

MSKTRHQEDMEEEEENLFYEVHEVVVHRLGHVPIAKGDFHYLPKNVQRYIAKWVQICKPRGIYIADGSEDEATEII
 HKLEERGMLHKLKQNNYIVRTDPADVARVESKTMCTQEKYDTPVPHVQPGVLGILGKWISPEEAQTNLDLYEG
 CMAGRMMYVIPFSMGPIGSPSLKIGVEITDSNYVLLCMRVMARVSPDVWHFLREGNGEFVRLHSMGCPRPSQRK
 TINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGK KCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTKKETF
 VAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGV LHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPNAMLTCTMTN
 SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGQNWRRGQPSKAAHPNSRFTCPAKQCPIIHPKWEDKKGVPI
 AFIFGGRPTGVPLVYEAFSWKHGVMIGATVKSEATAAAEFAGK SIMHDPMAMRPF LGYNFGKYLDHWLSMDKAP
 HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRRCGDDSIMIKSPIGYLPK KGSINMDGLGKINWDELF
 LPKHYWESDIEENIRFLDLQVGEDIPKAIREELAAQKKRIDEELFAEDGK

>CD7bug ID 752 (recouvrement sur 348 résidus en 2ème partie ; 39192 kDa et pI 5,73)

MSKTRHQEDMEEEEENLFYEVHEVVVHRLGHVPIAKGDFHYLPKNVQRYIAKWVQICKPRGIYIADGSEDEATEII
 HKLEERGMLHKLKQNNYIVRTDPADVARVESKTMCTQEKYDTPVPHVQPGVLGILGKWISPEEAQTNLDLYEG
 CMAGRMMYVIPFSMGPIGSPSLKIGVEITDSNYVLLCMRVMARVSPDVWHFLREGNGEFVRLHSMGCPRPSQRK
 TINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGK KCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTKKETF
 VAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGV LHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPNAMLTCTMTN
 SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGQNWRRGQPSKAAHPNSRFTCPAKQCPIIHPKWEDKKGVPI
 AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWKHGVMIGATVKSEATAAAEFAGK SIMHDPMAMRPF LGYNFGKYLDHWLSMDKAP
 HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRRCGDDSIMIKSPIGYLPK KGSINMDGLGKINWDELF
 LPKHYWESDIEENIRFLDLQVGEDIPKAIREELAAQKKRIDEELFAEDGK

>CD7bug 1184 (recouvrement sur les premiers 171 résidus ; 19759 kDa et pI 5,90)

MSKTRHQEDMEEEEENLFYEVHEVVVHRLGHVPIAKGDFHYLPKNVQRYIAKWVQICKPRGIYIADGSEDEATEII
 HKLEERGMLHKLKQNNYIVRTDPADVARVESKTMCTQEKYDTPVPHVQPGVLGILGKWISPEEAQTNLDLYEG
 CMAGRMMYVIPFSMGPIGSPSLKIGVEITDSNYVLLCMRVMARVSPDVWHFLREGNGEFVRLHSMGCPRPSQRK
 TINHWPCNPEKVFIGHFDPKREICSFSGSYGGNSILGK KCFALRIAGCIARDEGWLAEHMLIMGLTNEKTKKETF
 VAAAFPSACGKTNMAMLTSPIDYTVRCVGDDIAWMRFDKDGV LHGINPEAGFFGVCPGTNMKTNPNAMLTCTMTN
 SIFTNVAETADGGFFWEGLEDETDPHVTITDWLGQNWRRGQPSKAAHPNSRFTCPAKQCPIIHPKWEDKKGVPI
 AFIFGGRRPTGVPLVYEAFSWKHGVMIGATVKSEATAAAEFAGK SIMHDPMAMRPF LGYNFGKYLDHWLSMDKAP

HKLPKIFHVNWFRVDEEGQFMWPGFGDNVRVLDWIIRRCEGDDSIMIKSPIGYLPKKGSINMDGLGKINWDELFSLPKHYWESDIEENIRFLDLQVGEDIPKAIREELAAQKKRIDEELFAEDGK

Figure 58 : Couverture des séquences PEPCK chez la moule quagga. En jaune, les peptides reconnus sous X!tandem ; protéine entière (276) et formes partielles (644, 694, 752 et 1184).

On remarque que les peptides identifiés (en jaune) sont localisés sur l'ensemble de la séquence pour les protéoformes entières. Au contraire pour les formes partielles de PEPCK, les peptides identifiés sont localisés seulement sur une portion de la séquence, de façon cohérente avec la taille observée des protéoformes. En utilisant ces données et les informations sur la structure de la protéine, les parties conservées des protéoformes tronquées peuvent être extrapolées (figure 59).

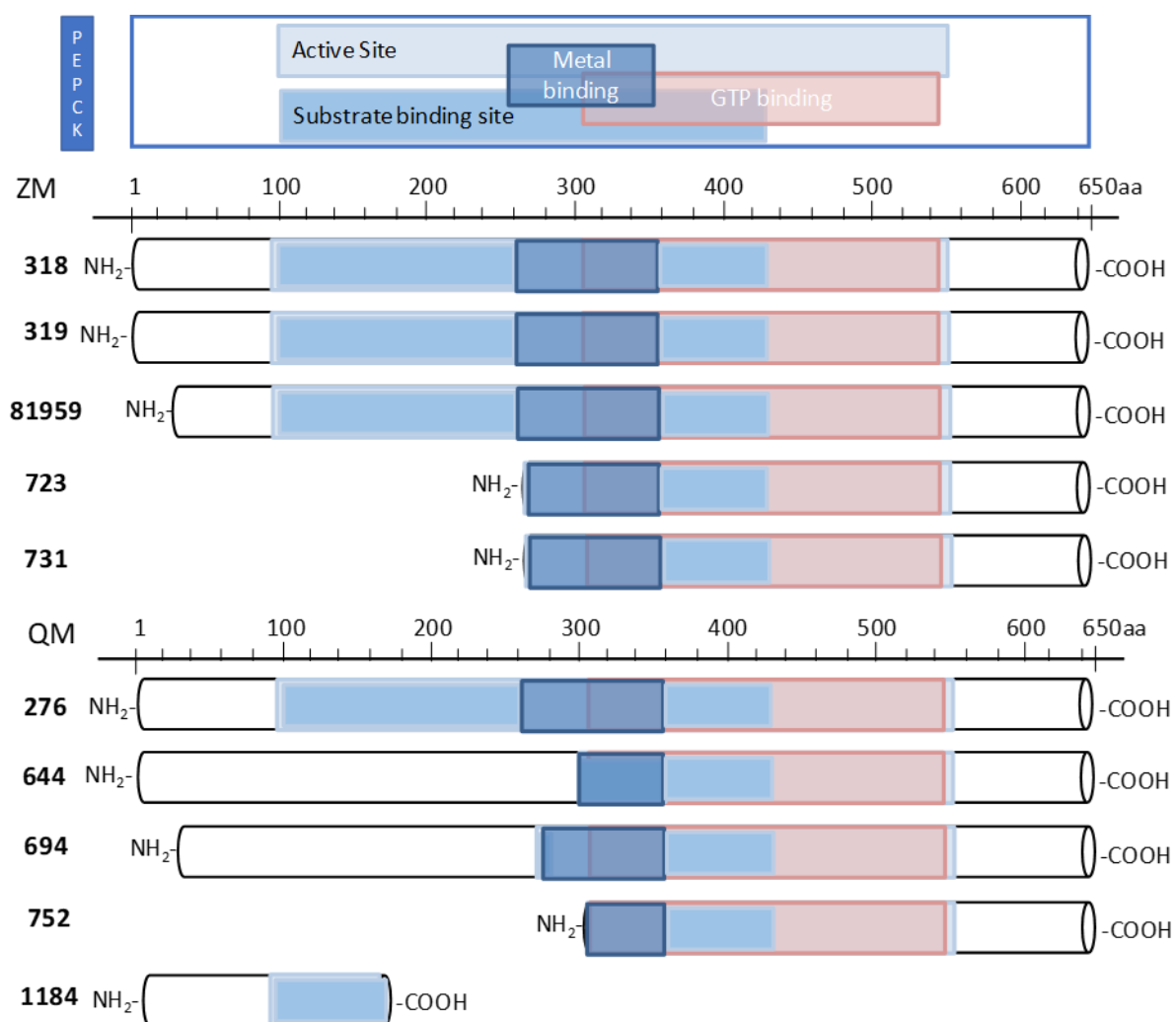


Figure 59 : Structure des PEPCK et positionnement des protéoformes sur la séquence. En partie haute, les différents domaines fonctionnels de la PEPCK : site actif, site de liaison au GTP, site de fixation du métal et zone d'interaction avec les substrats (NCBI CD batch search, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) ; en partie basse, les zones couvertes par les protéoformes modifiées chez les deux espèces de dreissène (ZM, *Dreissena polymorpha*) ; QM, *Dreissena r. bugensis*).

Les deux espèces de dreissène montrent des modifications de la taille de la PEPCK avec une délétion le plus souvent de la partie N-terminale, zone correspondant à la première partie du site actif de l'enzyme. Dans le cas particulier de la protéoforme 1184, seul un début de séquence est retrouvé.

L'analyse des structures secondaires de la PEPCK montre une organisation identique entre les séquences des deux espèces de dreissène. Dans l'hypothèse d'un clivage protéolytique, les sites potentiels de clivage à l'origine des protéoformes tronquées seraient situés en amont de la position 280 au niveau de zones exposées à la surface (figure 60).

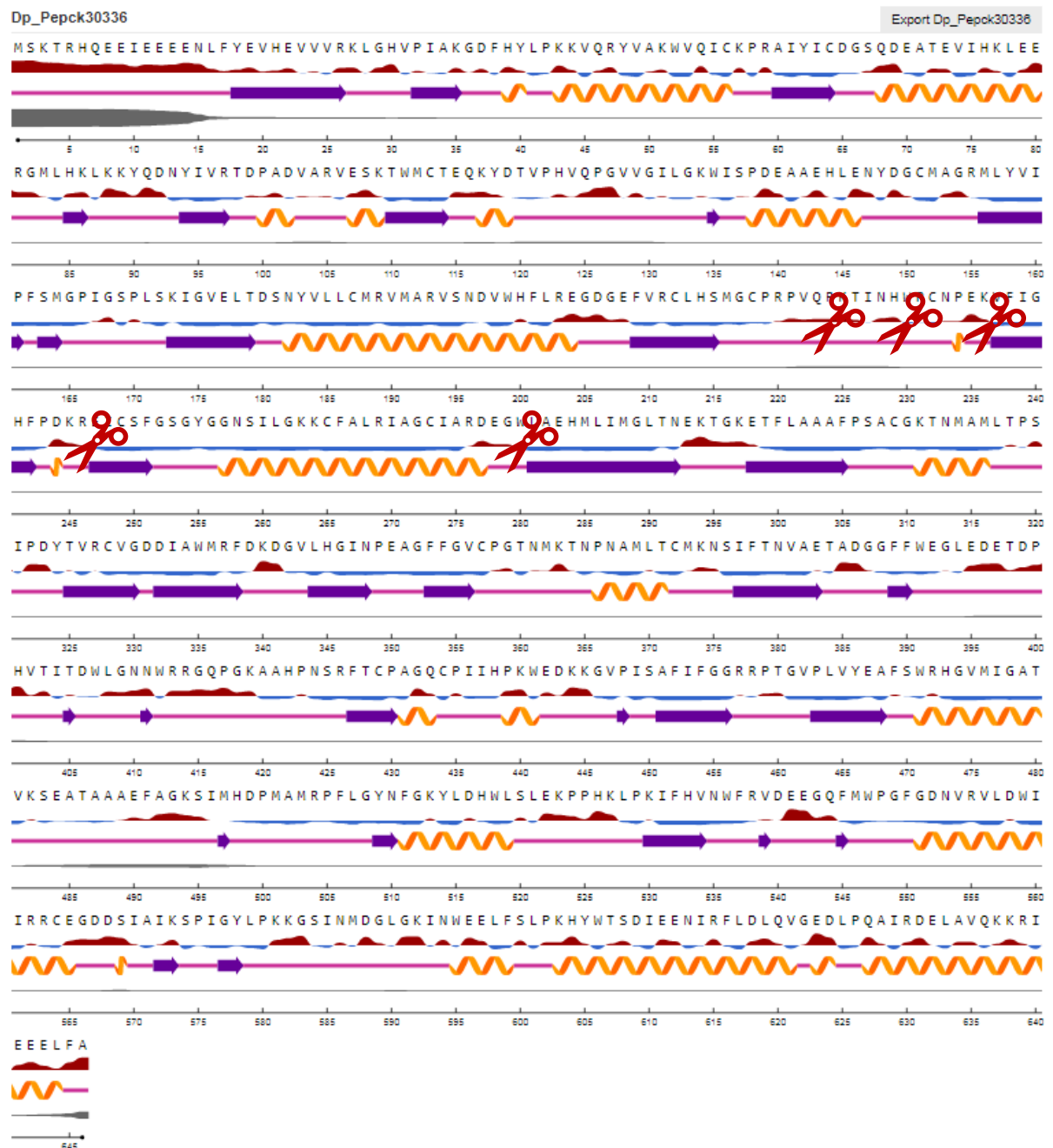


Figure 60 : Prédiction des structures secondaires de la séquence *D.r. bugensis* de PEPCK. Résultat obtenu par NetsurfP : flèche violette : feuillet beta, hélice orange : hélice alpha, gris : niveau de désordre, rouge :

exposition à la surface, bleu : niveau d'enfouissement. Les ciseaux pointes des zones potentielles de clivage.

V.3.4. Confrontation avec la littérature

La compréhension de l'importance métabolique des PEPCK s'est considérablement élargie ces dernières années avec la prise en compte de l'ensemble de leurs fonctions. Les PEPCK interviennent dans l'élimination des métabolites anioniques, dans les processus de biosynthèse ou bien dans la voie d'oxydation complète liée au cycle de Krebs (Yang et coll. 2009).

Chez les espèces où des isoformes cytosolique et mitochondriale sont décrites, l'isoforme cytosolique participe directement à la néoglucogénèse et à la néoglycéroneogenèse et celle mitochondriale est impliquée dans la régulation du métabolisme des acides aminés et de la réponse UPR (unfolded protein response), élément important pour maintenir la progression du cycle cellulaire et la survie des cellules, en particulier dans des conditions de stress (Méndez-Lucas et coll. 2014). Ainsi, chez l'Homme, la PEPCK2 est considérée comme un régulateur anti-apoptotique lors de privation d'acides aminés sans que le mécanisme de ce processus soit entièrement élucidé (Méndez-Lucas et coll. 2014). En ce qui concerne les modifications post-traductionnelles, des phosphorylations des PEPCK ont été récemment décrites, mais ce sont les acétylations qui constituent le levier majeur de régulation. Ainsi, la PEPCK1 de mammifère peut être acétylée, en particulier sur des lysines en position 244 et 290, ce qui conduit à une diminution de sa constante catalytique. Par ailleurs, quand la charge énergétique est basse, la phosphorylation d'une sérine en position adjacente de la lysine 91 entraîne la déacétylation de la PEPCK1 et favorise ainsi la formation de phosphoénolpyruvate. Inversement, quand la charge énergétique est élevée, la PEPCK1 est acétylée ce qui promeut la réaction inverse, et donc, la formation d'oxaloacétate (Latorre-Muro et coll. 2021). La demi-vie de la PEPCK1 est de 6 heures chez *Rattus norvegicus* et la phosphorylation de cette enzyme favorise son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome (Latorre-Muro et coll. 2021). Il est également établi que la PEPCK2 non acétylée est dirigée vers les lysosomes où elle est dégradée de façon indépendante du protéasome (Jing et coll. 2021).

Dans une expérience de répression de l'expression de la PEPCK2 par ARN interférant sur une lignée d'hépatocytes humains, un mécanisme original de compensation métabolique a été observé. L'acétylation d'une lysine en position K491 a déclenché une relocalisation de la PEPCK1 dans la mitochondrie, ce que les auteurs qualifient de transition de l'isozyme PEPCK1 vers la PEPCK2 (Jing et coll. 2021). Chez nos espèces, il n'est pas décrit de forme mitochondriale. Un mécanisme de transition d'isozymes régulé par acétylation pourrait amener une PEPCK unique à assurer à la fois les fonctions cytosolique et mitochondriale des PEPCK.

Chez les bivalves, Carroll et Coyne (2021) ont mis en évidence une augmentation de la PEPCK dans des hémocytes de *Haliotis abalone* dans le contexte d'une acidification de l'environnement. Dans le contexte d'une contamination à une bactérie, *Vibrio tapetis*, Smits et coll. (2020) ont observé une augmentation de la PEPCK chez *Ruditapes philippinarum*. Les auteurs avancent l'hypothèse d'un métabolisme cataplérotique pour assurer la survie de l'organisme en réponse au stress généré par l'infection. Une augmentation transcriptionnelle de la PEPCK a également été décrite chez *Ruditapes philippinarum* suite à une exposition à 1000 µg/L d'ibuprofène (Milan et coll. 2013). Au contraire, chez la dreissène, c'est une diminution d'abondance de la PEPCK qui apparaît après une exposition de 14 jours à la benzoylecgonine (Pedriali et coll. 2013). Chez *Mytilus*, une diminution de PEPCK a été identifiée également par 2DE lors d'une exposition à du zinc pyrithione (un biocide utilisé dans les shampoings antipelliculaires) (Dallas et coll. 2018).

De nombreux travaux sur les bivalves mesurent l'activité de la PEPCK, conjointement à celle de la pyruvate kinase pour estimer la capacité aérobie des tissus. Un rapport PK/PEPCK haut révèle une capacité aérobie élevée et inversement un rapport PK/PEPCK indique une bascule en anaérobie. L'activité de la PEPCK est aussi utilisée en contexte écotoxicologique. Des augmentations de l'activité de la PEPCK ont été mesurées après exposition au 2,4,6-trinitrotoluène de moules prélevées en mer baltique (Schuster et coll. 2021). Lors d'une étude de terrain dans une zone particulièrement contaminée, une diminution de l'activité de la PEPCK a été observée dans les glandes digestives mais pas dans les branchies (Lacroix et coll. 2015). Oliveira et coll. (2016) observent une surexpression marquée de la PEPCK lors d'une exposition de 2 jours au tralopyril (un composé anti-biosalissure). Globalement, les résultats associent l'augmentation de la PEPCK à une exposition aiguë afin de répondre à une demande accrue en énergie. À l'inverse, en cas d'exposition chronique, une diminution générale du métabolisme aérobie s'opère avec des niveaux d'activité PEPCK plus faibles (Schuster et coll. 2021).

Les nouvelles données concernant la PEPCK acquises ces dernières années et dans nos travaux renforcent l'intérêt d'approfondir l'étude de cette enzyme dans un contexte écotoxicologique. L'apparition de formes partielles chez la Dreissène mériterait d'être mieux caractérisée.

Discussion Générale

L'objectif principal de ce travail était d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu dans la réponse générale au stress en identifiant les acteurs protéiques impliqués dans l'homéostasie cellulaire des branchies de moules marines et dulcicoles. Cela s'est traduit par l'identification de grands groupes fonctionnels protéiques qui, de façon attendue, montre que la réponse générale au stress, bien connue chez les vertébrés, est également bien développée chez les bivalves.

Le recriblage des données a permis une nette amélioration des identifications ; toutefois pour les spectres de masse les plus anciens, leur moins bonne résolution reste une limite. Aussi, les identifications des premières études reposent sur seulement quelques peptides, ce qui les rend moins fiables et plus difficiles à exploiter. En particulier, la distinction entre des formes de protéines proches est délicate. Distinguer des isoformes qui ne diffèrent que de quelques acides aminés n'est pas toujours possible. En parallèle, la multiplication des données de génomique et de transcriptomique accessibles chez les bivalves a considérablement amélioré la qualité des identifications (figure 61). Cependant, l'analyse génomique de *Mytilus* a mis en évidence un pan-génome, ce qui amène un niveau de complexité supplémentaire dans l'interprétation des résultats (Gerdol et coll. 2020).

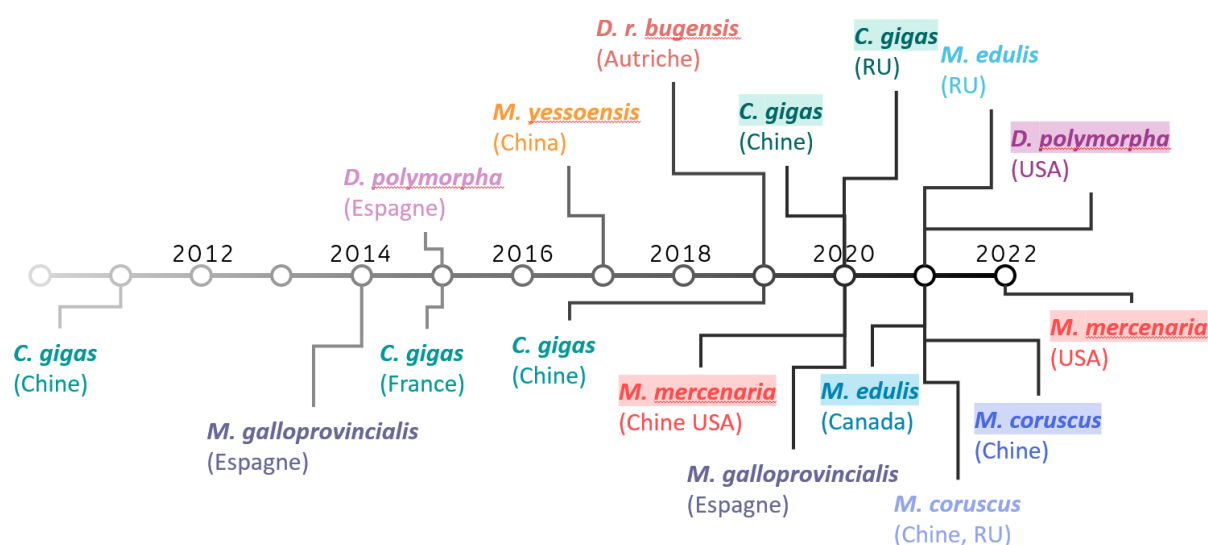


Figure 61 : Evolution du séquençage des génomes de bivalves, quelques exemples. Pour certains organismes, plusieurs séquençages ont été réalisés. Les génomes présentant un assemblage au niveau chromosomique sont surlignés. *C. gigas*, *Crassostrea gigas* ; *D. polymorpha*, *Dreissena polymorpha* ; *D. r. bugensis*, *Dreissena rostriformis bugensis* ; *M. mercenaria*, *Mercenaria mercenaria* ; *M. yessoensis*, *Mizuhopecten yessoensis* ; *M. coruscus*, *Mytilus coruscus* ; *M. edulis*, *Mytilus edulis* ; *M. galloprovincialis*, *Mytilus galloprovincialis*.

Par ailleurs, la possibilité d'utiliser des données de transcriptomique *Mytilus galloprovincialis* (tous tissus), *Dreissena polymorpha* (branchies) et *Dreissena rostriformis bugensis* (branchies), données obtenues dans un cadre collaboratif, a permis un criblage plus ciblé (Arnaud Tanguy, Station Biologique

de Roscoff, Laboratoire Adaptation et Diversité en Milieu Marin ; Elise David, UMRI02 Sebio, Université Champagne Ardennes ; Simon Devin, LIEC, Université de Lorraine ; Romain Péden, LIEC, Université de Lorraine, actuellement UMRI02 Sebio, Université Champagne Ardennes).

Le travail d'identification de protéines sur une espèce non-modèle reste cependant compliqué de par l'absence ou la moindre qualité des annotations des banques transcriptomiques sur lesquelles les identifications se basent. En effet, alors que des séquences sont mises à disposition en accès libre, elles ne sont pas toujours correctement annotées. Elles sont souvent sans identification. De plus, la séquence proposée n'est pas toujours la séquence codante, elle est parfois partielle ou, au contraire, beaucoup plus grande, ce qui impose une étape supplémentaire de nettoyage dans l'analyse.

Certains acteurs attendus, comme la catalase ou la GAPDH, n'ont pas été retenus dans l'étape de criblage. En effet, bien que retrouvés ponctuellement, ils ne sont pas apparus de façon assez récurrente pour être inclus dans nos résultats. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la faible occurrence de ces protéines dans nos études. D'abord, des limites méthodologiques existent dans la détection de certaines protéines, la 2DE ne mettant en évidence que les protéines les plus abondantes. Ainsi, des protéines très importantes dans la régulation des processus cellulaires, tels que les kinases et phosphatases typiques des transductions de signal ou les facteurs de transcription sont en quantité relative trop faible pour l'approche utilisée. Il est aussi possible que la redondance des systèmes avec des voies variées de déclenchement explique que ce ne sont pas systématiquement les mêmes éléments qui sont retrouvés en réponse à un stress donné, l'état physiologique de l'animal, son trait de vie intervenant aussi. Enfin, les réponses dépendant de la nature et de l'intensité des stress imposés, il serait intéressant de disposer d'un plus grand nombre d'études pour tirer encore plus d'informations de ce type d'approches rétrospectives.

Malgré ces limites, ce travail a permis de faire apparaître des éléments remarquables, parmi lesquels de fréquentes modifications post-traductionnelles. Ces modifications ont plusieurs significations potentielles. Elles pourraient simplement signaler des dégâts cellulaires dus à une protéolyse et impliqueraient alors un état de dépassement des défenses cellulaires. Elles pourraient, au contraire, sous-tendre l'apparition d'une protéoforme avec une fonctionnalité nouvelle. Autre hypothèse, les protéines modifiées pourraient être le résultat d'épissages alternatifs qui apparaîtraient en situation de stress. Dans les deux dernières situations, ces nouvelles formes peuvent être le reflet d'un niveau de régulation supplémentaire. Ces pistes sont à explorer pour déterminer quels mécanismes sont impliqués dans chacun des cas rencontrés. Notons que parmi les formes partielles régulièrement retrouvées, un certain nombre correspond à de l'actine cytoplasmique et à des tubulines alpha et bêta. Leur suivi spécifique devrait faire l'objet d'une étude plus approfondie pour

établir d'une part, si un lien existe entre leurs profils de fragmentation et le contexte écotoxicologique et, d'autre part si les formes partielles possèdent encore une fonction biologique.

S'il est difficile d'être affirmatif à l'heure actuelle quant aux rôles de ces protéoformes, la littérature recense des exemples de protéines modifiées exerçant une nouvelle fonction, souvent suite à un changement de compartiment cellulaire. Par exemple, l'aconitase cytosolique n'a une activité catalytique que lorsque les concentrations en fer sont normales. Si la concentration en fer est trop faible, l'aconitase perd son groupement [4Fe-4S] et, concomitamment, son activité enzymatique. Elle joue alors un nouveau rôle, devient une protéine régulatrice dans l'homéostasie du fer et, à ce titre, est appelée protéine de liaison à l'élément de réponse au fer 1 (ou IRP1). Lorsque l'aconitase cytosolique se transforme en IRP1, elle acquiert la capacité de se lier aux transcrits impliqués dans l'absorption, le stockage et l'utilisation du fer (Philpott, Klausner, et Rouault 1994). Autre exemple, l' α -énolase s'est révélée être, en plus de sa fonction canonique, un marqueur de surface dans le dégradosome (Cooper et coll. 1984 ; Paludo et coll. 2015). D'autres travaux ont confirmé que l' α -énolase fonctionne comme un récepteur du plasminogène chez de nombreuses espèces, avec pour effet, la stimulation de la voie MAPK dans un contexte anti-apoptotique (Díaz-Ramos et coll. 2012). Par ailleurs, une forme plus courte de l'énolase a été mise en évidence dans nos études. Chez l'Homme, elle a été identifiée comme myc promoteur binding protein 1, capable de se lier au promoteur c-myc et d'agir comme un répresseur transcriptionnel, l'activité enzymatique de l'énolase étant alors perdue (Feo et coll. 2000).

Plus généralement, ces travaux ont fait ressortir quatre grandes catégories fonctionnelles : les protéines de réponse au choc thermique, du système détox/redox, du cytosquelette et du métabolisme énergétique. Ces catégories sont attendues car elles participent à une réponse stéréotypée au stress. De fait, de nombreuses études en écotoxicologie soulignent déjà l'importance de ces grands processus dans la défense et l'adaptation des organismes intertidaux à des conditions environnementales dégradées. Il est remarquable que les protéines des voies de détoxification soient moins présentes que celles du métabolisme énergétique. Ce résultat pourrait traduire une surreprésentation des enzymes du métabolisme en termes de nombre et d'abondance dans l'approche protéomique utilisée. Cependant, les adaptations métaboliques sont un élément majeur dans la réponse au stress. Ainsi, Sokolova (2013) a établi une gradation permettant de catégoriser les variations métaboliques en fonction du stress subi : si un organisme est dans un environnement propice, les ressources énergétiques seront d'origine aérobie avec activation du stockage des réserves et croissance de l'organisme. Dans un environnement moyennement stressant, le métabolisme sera à un niveau de stress modéré et le flux énergétique sera réduit avec un métabolisme aérobie restreint, une synthèse de protéines de stress enclenchée et l'arrêt de la croissance de l'organisme au profit de

sa conservation dans un état correct. A un niveau de stress élevé, le métabolisme anaérobie prime, les ressources en énergie sont allouées uniquement aux fonctions basales, l'intégrité de l'organisme est menacée. Au niveau cellulaire, un stress oxydant est visible et, au niveau de l'organisme, les réserves énergétiques commencent à s'épuiser. Enfin, l'état léthal est caractérisé par des dégâts cellulaires importants, l'arrêt de fonctions intégratives. La survie à court terme est marquée par la déplétion du stock d'ATP et la voie aérobie est défaillante. L'ensemble de ces éléments, nous ont amené à porter une attention particulière à la PEPCK et à la MDH. Approfondir leur étude paraît prometteur, ces enzymes étant au carrefour des voies métaboliques alternatives de production de l'énergie. De façon intéressante, la PEPCK est soumise à des régulations par des phosphorylations/acétylations et nous formulons l'hypothèse que chez les bivalves, où actuellement une seule forme cytosolique est décrite, l'acétylation interviendrait dans la régulation métabolique permettant une transition de l'isoenzyme cytoplasmique en isoenzyme mitochondriale, comme montré dans des études réalisées dans un contexte de résistance au cancer (Jing et coll. 2021).

Il semble que l'on s'accorde de plus en plus à penser que des panels de marqueurs pourraient être en mesure de fournir la spécificité et la sensibilité qui font défaut aux marqueurs individuels. Par exemple, chez l'Homme, la combinaison de 4 marqueurs de protéines sériques pourrait être utilisée comme outil analytique dans le diagnostic de la pré-éclampsie et de sa sévérité (Cui et coll. 2018). Une recherche bibliométrique des termes « biomarkers », « panel » et « protein » révèle une émergence de la question dans les années 1980 avec une augmentation marquée du nombre de publications à partir des années 2000 jusqu'à aujourd'hui (figure 62).

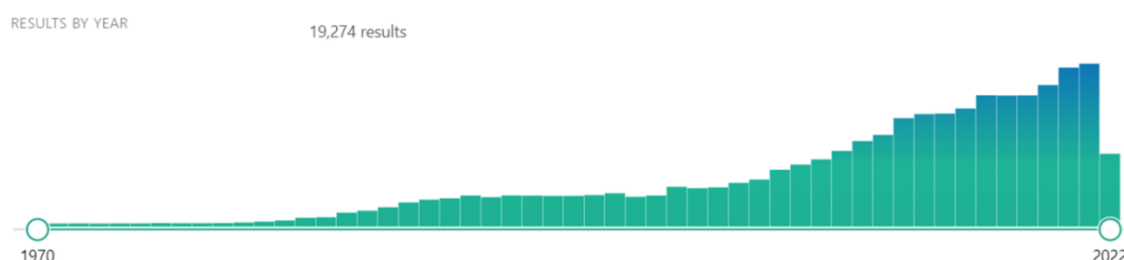


Figure 62 : Recherche bibliométrique Pubmed du nombre de publications mentionnant « panel » « biomarkers » et «protein » dans le titre et le résumé.

Les protéines issues du criblage réalisé pendant cette thèse ont toutes un potentiel de biomarqueur général de stress. Certaines de ces protéines sont des éléments de familles très conservées dont les isoformes spécifiques sont difficiles à distinguer. C'est le cas des HSP70, par exemple, qui globalement sont induites. En outre, une même protéine existe sous différentes formes, (phosphorylée, acétylée, ubiquitinylée...) et il est parfois difficile d'interpréter la signification de sa

variation, c'est-à-dire de déterminer si c'est une forme active ou inactive, par exemple, qui est modifiée. Il est possible de répartir les protéoformes sélectionnées en trois groupes, celui des marqueurs déjà exploités en biosurveillance (comme les HSP70), celui rassemblant des éléments connus pour leur implication dans la réponse générale au stress mais peu exploités en écotoxicologie aquatique et enfin un groupe d'acteurs moins bien documentés.

Parmi les biomarqueurs déjà exploités, la SOD est un biomarqueur du stress oxydant, souvent suivi au niveau enzymatique et transcriptionnel. Ces protéines convertissent les radicaux superoxydes en oxygène et en peroxyde d'hydrogène ce qui, couplé à l'activité de la catalase, protège les cellules des dégâts oxydants liés au métabolisme aérobie. Cette protéine est largement exploitée comme biomarqueur dans les études sur l'impact d'un contaminant sur l'environnement par des mesures de son niveau d'expression ou de son activité. L'activité de la SOD a ainsi été mesurée dans de nombreuses études de terrain et aussi lors d'exposition en conditions contrôlées à des stress chimiques, thermiques, osmotiques, et même biologiques, lors d'infections par des pathogènes. L'activité de la SOD est souvent mesurée en même temps que celles d'autres enzymes du système antioxydant comme la catalase, la glutathion peroxydase, la glutathion S-transférase ainsi que la mesure des taux de glutathion réduit/oxydé et des lipoperoxydations.

Parmi les protéines connues pour leur implication dans la réponse générale au stress mais encore peu suivies dans les études en écotoxicologie, citons les HSP40 (qui sont augmentées dans 5 études, STM21K, CAN3YP, CAN3LH, HAP 7 et Cd7Pol) et les 14-3-3, des protéines au carrefour de nombreuses voies physiologiques. De fait, les 14-3-3 sont connues pour participer à la régulation de nombreux processus cellulaires comme l'apoptose, la division cellulaire, la transcription et le trafic cellulaire.

Dans le groupe des acteurs de la réponse au stress les moins bien documentés, retenons la Major Vault protéine, une protéine impliquée dans le trafic cellulaire et le transport nucléocytoplasmique des ribosomes mais également identifiée comme élément de résistance aux médicaments (Kong et coll. 1999). Un élément qui ressort de ces travaux est l'apparition de fragments de l'ordre de 50 kDa qui ont également été détectés chez d'autres espèces et pourraient avoir un potentiel prometteur en tant que biomarqueurs (Grossi et coll. 2020 ; Stewart et coll. 2005). L'hypothèse formulée est qu'une induction des MVP a un effet cytoprotecteur et que sa dégradation ciblée sensibilise les cellules à l'apoptose.

Conclusion - Perspectives

En conclusion, ce travail a conduit à identifier une soixantaine de protéines appartenant à 4 grands groupes fonctionnels impliqués dans la réponse générale au stress : des protéines chaperonnes intervenant dans le recyclage, le repliement et le maintien des conformations des protéines ; des acteurs associés à la dynamique du cytosquelette ; des enzymes impliquées dans le maintien de la production d'ATP et enfin des enzymes participant à l'équilibre redox de la cellule.

Une synthèse graphique est proposée en figure 63. La plupart de ces protéines ont déjà été retrouvées dans les études écotoxicologiques, certaines sont régulièrement suivies. Une sélection de candidats qui mériteraient une attention plus particulière est proposée : les HSP40, le couple MDH1/MDH2, la Cu-Zn SOD dans son rôle de senseur de stress et des formes modifiées des tublines. Des éléments plus novateurs ont été mis en évidence parmi lesquels des protéoformes plus courtes de la MVP, des protéines du cytosquelette, en particulier de l'actine, et de la phosphoénolpyruvate carboxykinase.

On remarque l'implication régulière des mêmes protéines avec des variations qui ne répondent pas à un schéma unique. Il est souvent difficile d'interpréter la signification de la variation : identifier la protéine ne suffit pas, la caractérisation poussée de la protéoforme pourrait permettre de déterminer si c'est une forme active ou inactive, par exemple, qui est modifiée.

De plus, les modifications de la taille des protéines observées pourraient traduire des dégâts cellulaires et impliquer un état de dépassement des défenses cellulaires. Il est également possible que des protéoformes modifiées aient une fonctionnalité nouvelle et soient le résultat d'épissages alternatifs ou de protéolyses ciblées. Dans cette hypothèse, ces nouvelles formes peuvent refléter un niveau de régulation supplémentaire.

Les candidats mis en évidence dans ce travail devront faire l'objet d'études ultérieures afin de vérifier leur pertinence et leur applicabilité en surveillance environnementale. Il devrait être envisagé de les tester en utilisant les méthodes d'analyse classiques de la biosurveillance (niveaux d'expression, abondance, activité enzymatique). Dans cette perspective, il s'agirait de réaliser des Western blots avec des immunodétections. Une étude complémentaire pourrait se faire par qRT-PCR afin de croiser les niveaux protéiques et transcriptionnels.

Par ailleurs, les modifications post-traductionnelles pourraient être prises en compte. En effet, elles peuvent révéler un changement de fonction (protéines multitâches) et s'accompagner d'une relocalisation intracellulaire. Elles peuvent, en outre, indiquer une perte de fonction ou une dégradation. Ainsi un suivi spécifique de formes tronquées de protéines (actine, tubuline...) devrait être réalisé pour juger de leur pertinence comme outils en biosurveillance. Là encore une approche par Western blot est possible. Elle pourrait être complétée par de la spectrométrie de masse ciblée.

Enfin, une recherche des protéases capables d'assurer les clivages protéolytiques observés devrait également être menée.

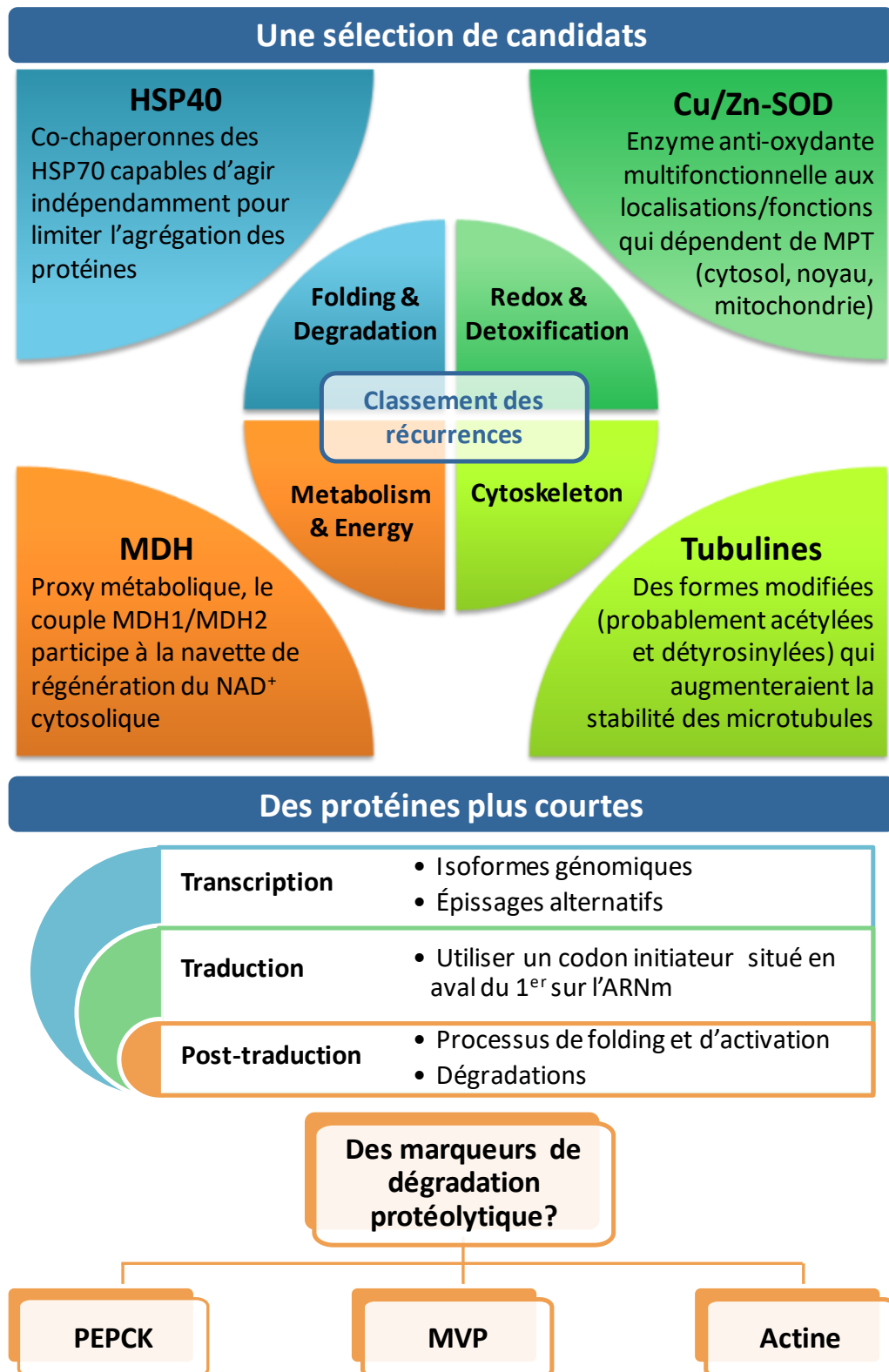


Figure 63 : Synthèse graphique des principaux résultats.

Bibliographie

- Abdel-Latif, Hany M.R., Mahmoud A.O. Dawood, Simon Menanteau-Ledouble, et Mansour El-Matbouli. 2020. « Environmental Transformation of N-TiO₂ in the Aquatic Systems and Their Ecotoxicity in Bivalve Mollusks: A Systematic Review ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 200 (septembre): 110776. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110776>.
- Abele, Doris, Thomas Brey, et Eva Philipp. 2009. « Bivalve models of aging and the determination of molluscan lifespans ». *Experimental Gerontology* 44 (5): 307. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.02.012>.
- Adoutte, André, Guillaume Balavoine, Nicolas Lartillot, Olivier Lespinet, Benjamin Prud'homme, et Renaud de Rosa. 2000. « The new animal phylogeny: Reliability and implications ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (9): 4453-56.
- Albayrak, Serhat, Gülrüh Albayrak, Mine Terzi Çelikkol, Aylin Gazdağlı, Emre Yörük, et Senem Çağlar. 2019. « The Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds on Antioxidant Enzyme Activities in *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 from Istanbul Strait ». *Marine Pollution Bulletin* 149 (décembre): 110662. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110662>.
- Aldridge, David C, Paul Elliott, et Geoff D Moggridge. 2004. « The Recent and Rapid Spread of the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) in Great Britain ». *Biological Conservation* 119 (2): 253-61. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2003.11.008>.
- Ali Khan, Hyder, et Bulent Mutus. 2014. « Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles ». *Frontiers in Chemistry* 2. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2014.00070>.
- Ambrosio, Letizia, Rosario Russo, Anna Maria Salzano, Francesco Paolo Serpe, Andrea Ariano, Nunziatina De Tommasi, Fabrizio Dal Piaz, et Lorella Severino. 2018. « Accumulation of Polychlorinated Biphenyls in Mussels: A Proteomic Study ». *Journal of Food Protection* 81 (2): 316-24. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-148>.
- Amiard-Triquet, Claude. 2019. « 2 - Pollution Tolerance in Aquatic Animals: From Fundamental Biological Mechanisms to Ecological Consequences ». In *Ecotoxicology*, édité par E. Gross et J. Garric, 33-91. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-314-1.50002-X>.
- Amiard-Triquet, Claude, Jean-Claude Amiard, et Philip S. Rainbow, éd. 2013. *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*. Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b13036>.
- Amos, Linda A., et Daniel Schlieper. 2005. « Microtubules and Maps ». In *Advances in Protein Chemistry*, 71:257-98. Fibrous Proteins: Muscle and Molecular Motors. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(04\)71007-4](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(04)71007-4).
- Anand, P. P., et Y. Shibu Vardhanan. 2020. « Computational Modelling of Wet Adhesive Mussel Foot Proteins (Bivalvia): Insights into the Evolutionary Convolution in Diverse Perspectives ». *Scientific Reports* 10 (1): 2612. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59169-y>.
- Antonov, Pl. 1993. « On invasion of bivalve mollusc *Dreissena bugensis* (Andr.) into the Volga reservoirs. In: Ecological Problems of the Large River Basins ».
- Arrighetti, Noemi, Claudia Corbo, Michael Evangelopoulos, Anna Pastò, Valentina Zuco, et Ennio Tasciotti. 2019. « Exosome-like nanovectors for drug delivery in cancer ». *Current medicinal chemistry* 26 (33): 6132-48. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180831150259>.
- Artimo, Panu, Manohar Jonnalagedda, Konstantin Arnold, Delphine Baratin, Gabor Csardi, Edouard de Castro, Séverine Duvaud, et al. 2012. « ExPASy: SIB bioinformatics resource portal ». *Nucleic Acids Research* 40 (W1): W597-603. <https://doi.org/10.1093/nar/gks400>.
- Azevedo, Catarina C., Remédios Guzmán-Guillén, José C. Martins, Hugo Osório, Vitor Vasconcelos, Rute R. da Fonseca, et Alexandre Campos. 2015. « Proteomic Profiling of Gill GSTs in *Mytilus galloprovincialis* from the North of Portugal and Galicia Evidences Variations at Protein Isoform Level with a Possible Relation with Water Quality ». *Marine Environmental Research* 110 (septembre): 152-61. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.08.008>.
- Barjhoux, Iris, Damien Rioult, Alain Geffard, et Melissa Palos Ladeiro. 2020. « A New Protocol for the Simultaneous Flow Cytometric Analysis of Cytotoxicity and Immunotoxicity on Zebra Mussel

- (*Dreissena polymorpha*) Hemocytes ». *Fish & Shellfish Immunology* 98 (mars): 224-35. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.092>.
- Beiras, Ricardo. 2018. « Chapter 17 - Marine Pollution Monitoring Programs ». In *Marine Pollution*, édité par Ricardo Beiras, 293-311. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813736-9.00017-9>.
- Benson & Raikow. 2008. « ISSG Database: Distribution of *Dreissena polymorpha* ». 2008. http://issg.org/database/species/distribution_display.asp?si=50&ri=18873&pc=*&sts=sss&status=Alien&lang=EN.
- Berger, W., E. Steiner, M. Grusch, L. Elbling, et M. Micksche. 2008. « Vaults and the Major Vault Protein: Novel Roles in Signal Pathway Regulation and Immunity ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 66 (1): 43. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8364-z>.
- Besse, Jean-Philippe, Olivier Geffard, et Marina Coquery. 2012. « Relevance and Applicability of Active Biomonitoring in Continental Waters under the Water Framework Directive ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Chemical Monitoring Activity for the Implementation of the Water Framework Directive, 36 (juin): 113-27. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.04.004>.
- Beyer, Jonny, Norman W. Green, Steven Brooks, Ian J. Allan, Anders Ruus, Tânia Gomes, Inger Lise N. Bråte, et Merete Schøyen. 2017a. « Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review ». *Marine Environmental Research* 130: 338-65. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.07.024>.
- Binelli, A., R. Bacchetta, G. Vailati, S. Galassi, et A. Provini. 2001. « DDT Contamination in Lake Maggiore (N. Italy) and Effects on Zebra Mussel Spawning ». *Chemosphere* 45 (4): 409-15. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00048-0).
- Binelli, A., C. Della Torre, S. Magni, et M. Parolini. 2015. « Does Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) Represent the Freshwater Counterpart of *Mytilus* in Ecotoxicological Studies? A Critical Review ». *Environmental Pollution* 196 (janvier): 386-403. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.023>.
- Biomarkers Definitions Working Group. 2001. « Biomarkers and Surrogate Endpoints: Preferred Definitions and Conceptual Framework ». *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 69 (3): 89-95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>.
- Blier, Pierre U., Doris Abele, Daniel Munro, Cyril Degletagne, Enrique Rodriguez, et Tory Hagen. 2017. « What Modulates Animal Longevity? Fast and Slow Aging in Bivalves as a Model for the Study of Lifespan ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Science communication in the field of fundamental biomedical research, 70 (octobre): 130-40. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.046>.
- Boegehold, Anna G., Nicholas S. Johnson, et Donna R. Kashian. 2019. « Dreissenid (Quagga and Zebra Mussel) Veligers Are Adversely Affected by Bloom Forming Cyanobacteria ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 182 (octobre): 109426. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109426>.
- Boland, Karen, Lorna Flanagan, Niamh McCawley, Ritesh Pabari, Elaine W. Kay, Deborah A. McNamara, Frank Murray, et al. 2016. « Targeting the 19S Proteasomal Subunit, Rpt4, for the Treatment of Colon Cancer ». *European Journal of Pharmacology* 780 (juin): 53-64. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.03.031>.
- Bolognesi, C., et P. Degan. 2001. « Chapter 3 - genotoxicity biomarkers in aquatic organisms as indicators of carcinogenic marine pollutants ». In *Biomarkers in Marine Organisms*, édité par Philippe Garrigues, Hartmut Barth, Colin H. Walker, et Jean François Narbonne, 45-64. Amsterdam: Elsevier Science. <https://doi.org/10.1016/B978-044482913-9/50005-5>.
- Borcherding, Jost. 1991. « The Annual Reproductive Cycle of the Freshwater Mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in Lakes ». *Oecologia* 87 (2): 208-18.
- Bouchet, Philippe, Jean-Pierre Rocroi, Rüdiger Bieler, Joseph Carter, et Eugene Coan. 2010. « Nomenclator of bivalve families with a classification of bivalve families ». *Malacologia* 52 (mai): 1-184. <https://doi.org/10.4002/040.052.0201>.

- Braby, C. E. 2006. « Following the Heart: Temperature and Salinity Effects on Heart Rate in Native and Invasive Species of Blue Mussels (Genus *Mytilus*) ». *Journal of Experimental Biology* 209 (13): 2554-66. <https://doi.org/10.1242/jeb.02259>.
- Brackley, Karen I., et Julie Grantham. 2009. « Activities of the chaperonin containing TCP-1 (CCT): implications for cell cycle progression and cytoskeletal organisation. » *Cell Stress & Chaperones* 14 (1): 23-31. <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0057-x>.
- Bradford, Marion M. 1976. « A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding ». *Analytical Biochemistry* 72: 258-254.
- Braun, Beate C., Michael Glickman, Regine Kraft, Burkhardt Dahlmann, Peter-M. Kloetzel, Daniel Finley, et Marion Schmidt. 1999. « The Base of the Proteasome Regulatory Particle Exhibits Chaperone-like Activity ». *Nature Cell Biology* 1 (4): 221-26. <https://doi.org/10.1038/12043>.
- Brodey, Mary M., et Stephen H. Bishop. 1991. « Malate Dehydrogenase Isoforms from Ribbed Mussel (*Modiolus demissus*) Gill Tissue ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 100 (4): 775-82. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90289-P](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90289-P).
- Brown, Jonathon D., Alison M. Day, Sarah R. Taylor, Lewis E. Tomalin, Brian A. Morgan, et Elizabeth A. Veal. 2013. « A Peroxiredoxin Promotes H₂O₂ Signaling and Oxidative Stress Resistance by Oxidizing a Thioredoxin Family Protein ». *Cell Reports* 5 (5): 1425-35. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.036>.
- Buccitelli, Christopher, et Matthias Selbach. 2020. « MRNAs, Proteins and the Emerging Principles of Gene Expression Control ». *Nature Reviews Genetics*, juillet, 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0258-4>.
- Budenholzer, Lauren, Chin Leng Cheng, Yanjie Li, et Mark Hochstrasser. 2017. « Proteasome Structure and Assembly ». *Journal of Molecular Biology, Molecular Mechanisms and Regulation in the Ubiquitin System*, 429 (22): 3500-3524. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.027>.
- Bultelle, Florence, Romain Péden, Agnès Poret, Stéphanie Olivier, Philippe Chan, David Vaudry, Frank LE Foll, et Beatrice Rocher. 2017. « Étude du protéome branchial de la moule bleue : vers un outil de surveillance environnemental ». *Spectra Analyses*, 314: 53-58
- Campos, Alexandre, Gabriela Danielsson, Ana Paula Farinha, Jacob Kuruvilla, Per Warholm, et Susana Cristobal. 2016. « Shotgun Proteomics to Unravel Marine Mussel (*Mytilus edulis*) Response to Long-Term Exposure to Low Salinity and Propranolol in a Baltic Sea Microcosm ». *Journal of Proteomics, Environment and (Prote)-OMICS*, 137 (mars): 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.01.010>.
- Campos, Alexandre, Sara Tedesco, Vitor Vasconcelos, et Susana Cristobal. 2012. « Proteomic research in bivalves: Towards the identification of molecular markers of aquatic pollution ». *Journal of Proteomics, Special Issue: Farm Animal Proteomics*, 75 (14): 4346-59. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.027>.
- Campos, Gustavo de los, Yogasudha Veturi, Ana I. Vazquez, Christina Lehermeier, et Paulino Pérez-Rodríguez. 2015. « Incorporating Genetic Heterogeneity in Whole-Genome Regressions Using Interactions ». *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 20 (4): 467-90. <https://doi.org/10.1007/s13253-015-0222-5>.
- Cannon, Walter B. 1929. « Organization for physiological homeostasis ». *Physiological Reviews* 9 (3): 399-431. <https://doi.org/10.1152/physrev.1929.9.3.399>.
- Carbonara, Katrina, Martin Andonovski, et Jens Coorssen. 2021. « Proteomes Are of Proteoforms: Embracing the Complexity ». *Proteomes* 9(3): 38. <https://doi.org/10.3390/proteomes9030038>.
- Carlson, Gerald M., et Todd Holyoak. 2009. « Structural Insights into the Mechanism of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Catalysis ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (40): 27037-41. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.040568>.
- Carroll, Sarah L., et Vernon E. Coyne. 2021. « A proteomic analysis of the effect of ocean acidification on the haemocyte proteome of the South African abalone *Haliotis midae* ». *Fish & Shellfish Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.08.008>.

- Catteau, Audrey, Antoine Le Guernic, Adrien Marchand, Younes M. I. Hani, Olivier Palluel, Cyril Turiès, Anne Bado-Nilles, Odile Dedourge-Geffard, Alain Geffard, et Jean-Marc Porcher. 2019. « Impact of Confinement and Food Access Restriction on the Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) during Caging: A Multi-Biomarker Approach ». *Fish Physiology and Biochemistry* 45 (4): 1261-76. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00670-1>.
- Chae, H. Z., K. Robison, L. B. Poole, G. Church, G. Storz, et S. G. Rhee. 1994. « Cloning and Sequencing of Thiol-Specific Antioxidant from Mammalian Brain: Alkyl Hydroperoxide Reductase and Thiol-Specific Antioxidant Define a Large Family of Antioxidant Enzymes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (15): 7017-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.7017>.
- Chalfie, Martin, et Thomson. 1982. « Structural and functional diversity in the neuronal microtubules of *Caenorhabditis elegans* ». *The Journal of Cell Biology* 93 (1): 15-23.
- Chen, Kai-Chun, Song Qu, Saikat Chowdhury, Isabelle C Noxon, Joseph D Schonhoft, Lars Plate, Evan T Powers, Jeffery W Kelly, Gabriel C Lander, et R Luke Wiseman. 2017. « The endoplasmic reticulum HSP40 co-chaperone ERdj3/DNAJB11 assembles and functions as a tetramer ». *The EMBO Journal* 36 (15): 2296-2309. <https://doi.org/10.15252/embj.201695616>.
- Chenna, Ramu, Hideaki Sugawara, Tadashi Koike, Rodrigo Lopez, Toby J. Gibson, Desmond G. Higgins, et Julie D. Thompson. 2003. « Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs ». *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3497-3500. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg500>.
- Choi, Jin Soo, Kanghee Kim, Kyungil Park, et June-Woo Park. 2022. « Long-Term Exposure of the Mediterranean Mussels, *Mytilus galloprovincialis* to Polyethylene Terephthalate Microfibers: Implication for Reproductive and Neurotoxic Effects ». *Chemosphere* 299 (juillet): 134317. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134317>.
- Clark, Melody S., Lloyd S. Peck, et Jakob Thyrring. 2021. « Resilience in Greenland Intertidal *Mytilus*: The Hidden Stress Defense ». *Science of The Total Environment* 767 (mai): 144366. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144366>.
- Clayton, Maureen E, Roland Steinmann, et Karl Fent. 2000. « Different Expression Patterns of Heat Shock Proteins Hsp 60 and Hsp 70 in Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*) Exposed to Copper and Tributyltin ». *Aquatic Toxicology* 47 (3): 213-26. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00022-3](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00022-3).
- Collins, Christina L., Nicholas P. Burnett, Matthew J. Ramsey, Kaitlyn Wagner, et Mackenzie L. Zippay. 2020. « Physiological Responses to Heat Stress in an Invasive Mussel *Mytilus galloprovincialis* Depend on Tidal Habitat ». *Marine Environmental Research* 154 (février): 104849. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104849>.
- Combosch, David J., Timothy M. Collins, Emily A. Glover, Daniel L. Graf, Elizabeth M. Harper, John M. Healy, Gisele Y. Kawauchi, et al. 2017. « A Family-Level Tree of Life for Bivalves Based on a Sanger-Sequencing Approach ». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 107 (février): 191-208. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.11.003>.
- Cooper, J. A., F. S. Esch, S. S. Taylor, et T. Hunter. 1984. « Phosphorylation Sites in Enolase and Lactate Dehydrogenase Utilized by Tyrosine Protein Kinases in Vivo and in Vitro ». *The Journal of Biological Chemistry* 259 (12): 7835-41.
- Cui, Lifeng, Chang Shu, Zitao Liu, Weihua Tong, Miao Cui, Chengguo Wei, Jian Jenny Tang, et al. 2018. « Serum Protein Marker Panel for Predicting Preeclampsia ». *Pregnancy Hypertension* 14 (octobre): 279-85. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.01.009>.
- Curpan, Alexandrina-Stefania, Federica Impellitteri, Gabriel Plavan, Alin Ciobica, et Caterina Faggio. 2022. « Review: *Mytilus galloprovincialis*: An Essential, Low-Cost Model Organism for the Impact of Xenobiotics on Oxidative Stress and Public Health ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 256 (juin): 109302. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109302>.
- Daguin, Claire, François Bonhomme, et Philippe Borsa. 2001. « The Zone of Sympatry and Hybridization of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*, as Described by Intron Length Polymorphism at Locus Mac-1 ». *Heredity* 86 (3): 342-54. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00832.x>.

- Dahlhoff, Elizabeth, Jonathon Stillman, et Bruce Menge. 2002. « Physiological Community Ecology: Variation in Metabolic Activity of Ecologically Important Rocky Intertidal Invertebrates Along Environmental Gradients ». *Integrative and comparative biology* 42 (août): 862-71. <https://doi.org/10.1093/icb/42.4.862>.
- Dallas, Lorna J., Andrew Turner, Tim P. Bean, Brett P. Lyons, et Awadhesh N. Jha. 2018. « An Integrated Approach to Assess the Impacts of Zinc Pyrithione at Different Levels of Biological Organization in Marine Mussels ». *Chemosphere* 196 (avril): 531-39. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.144>.
- Dang, Xibei, Jenna Scotcher, Si Wu, Rosalie K. Chu, Nikola Tolić, Ioanna Ntai, Paul M. Thomas, et al. 2014. « The first pilot project of the consortium for top-down proteomics: A status report ». *Proteomics* 14 (10): 1130-40. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300438>.
- Das, Dividutta, Yi-Hsuan Wang, Cheng-Ying Hsieh, et Yuichiro J. Suzuki. 2016. « Major Vault Protein Regulates Cell Growth/Survival Signaling through Oxidative Modifications ». *Cellular Signalling* 28 (1): 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.10.007>.
- Depledge, M. H., et M. C. Fossi. 1994. « The Role of Biomarkers in Environmental Assessment (2). Invertebrates ». *Ecotoxicology (London, England)* 3 (3): 161-72. <https://doi.org/10.1007/BF00117081>.
- Detienne, Giel, Wouter De Haes, Lucas Mergan, Samantha L. Edwards, Liesbet Temmerman, et Sven Van Bael. 2018. « Beyond ROS Clearance: Peroxiredoxins in Stress Signaling and Aging ». *Ageing Research Reviews* 44 (juillet): 33-48. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.03.005>.
- Détrée, Camille, et Cristian Gallardo-Escárate. 2018. « Single and Repetitive Microplastics Exposures Induce Immune System Modulation and Homeostasis Alteration in the Edible Mussel *Mytilus galloprovincialis* ». *Fish & Shellfish Immunology* 83 (décembre): 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.018>.
- Díaz-Ramos, Àngels, Anna Roig-Borrellas, Ana García-Melero, et Roser López-Alemany. 2012. « α -Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations ». Research article. *BioMed Research International*. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/156795>.
- Dimova, Evgeniya G., Peter E. Bryant, et Stephka G. Chankova. 2008. « Adaptive Response: Some Underlying Mechanisms and Open Questions ». *Genetics and Molecular Biology* 31 (2): 396-408. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000300002>.
- Distel, Daniel L., Marvin A. Altamia, Zhenjian Lin, J. Reuben Shipway, Andrew Han, Imelda Forteza, Rowena Antemano, et al. 2017. « Discovery of Chemoautotrophic Symbiosis in the Giant Shipworm *Kuphus polythalamia* (Bivalvia: Teredinidae) Extends Wooden-Steps Theory ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (18): E3652-58. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620470114>.
- Diz, Angel P., Mónica Martínez-Fernández, et Emilio Rolán-Alvarez. 2012. « Proteomics in Evolutionary Ecology: Linking the Genotype with the Phenotype: PROTEOMICS IN EVOLUTIONARY ECOLOGY ». *Molecular Ecology* 21 (5): 1060-80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05426.x>.
- Dogterom, Marileen, et Gijsje H. Koenderink. 2019. « Actin–Microtubule Crosstalk in Cell Biology ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (1): 38-54. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0067-1>.
- Dominguez, Roberto, et Kenneth C. Holmes. 2011. « Actin Structure and Function ». *Annual review of biophysics* 40 (juin): 169-86. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>.
- Domon, Bruno, et Ruedi Aebersold. 2006. « Mass Spectrometry and Protein Analysis ». *Science (New York, N.Y.)* 312 (5771): 212-17. <https://doi.org/10.1126/science.1124619>.
- Duroudier, Nerea, Câtia Cardoso, Kahina Mehennaoui, Mathilde Mikolaczyk, Jörg Schäfer, Arno C. Gutleb, Laure Giamberini, Maria J. Bebianno, Eider Bilbao, et Miren P. Cajaraville. 2019a. « Changes in Protein Expression in Mussels *Mytilus galloprovincialis* Dietarily Exposed to PVP/PEI Coated Silver Nanoparticles at Different Seasons ». *Aquatic Toxicology* 210 (mai): 56-68. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.010>.

- Duroudier, Nerea, Pablo Markaide, Miren P. Cajaraville, et Eider Bilbao. 2019. « Season Influences the Transcriptomic Effects of Dietary Exposure to PVP/PEI Coated Ag Nanoparticles on Mussels *Mytilus galloprovincialis* ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 222 (août): 19-30. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.03.010>.
- Dwivedi, Vandita, Karina Yaniv, et Michal Sharon. 2021. « Beyond Cells: The Extracellular Circulating 20S Proteasomes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1867 (3): 166041. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.166041>.
- Eau France, Le Service Public d'Information sur l'Eau. <https://www.eaufrance.fr/les-principaux-textes-en-vigueur>, consulté le 01 juillet 2022.
- Elias, Joshua E., Wilhelm Haas, Brendan K. Faherty, et Steven P. Gygi. 2005. « Comparative Evaluation of Mass Spectrometry Platforms Used in Large-Scale Proteomics Investigations ». *Nature Methods* 2 (9): 667-75. <https://doi.org/10.1038/nmeth785>.
- Evariste, Lauris, Michel Auffret, Sandra Audonnet, Alain Geffard, Elise David, Pauline Brousseau, Michel Fournier, et Stéphane Betoulle. 2016. « Functional Features of Hemocyte Subpopulations of the Invasive Mollusk Species *Dreissena polymorpha* ». *Fish & Shellfish Immunology* 56 (septembre): 144-54. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.054>.
- Fabbri, Elena, Paola Valbonesi, et Silvia Franzellitti. 2008. « HSP expression in bivalves ». In *ISJ-Invertebrate Survival Journal* 5 (2008): 135-161. .
- Faria, Melissa, Luis Carrasco, Sergi Diez, Maria Carmen Riva, Josep Maria Bayona, et Carlos Barata. 2009. « Multi-Biomarker Responses in the Freshwater Mussel *Dreissena polymorpha* Exposed to Polychlorobiphenyls and Metals ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149 (3): 281-88. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.012>.
- Fees, Colby P., et Jeffrey K. Moore. 2018. « Regulation of Microtubule Dynamic Instability by the Carboxy-Terminal Tail of β -Tubulin ». *Life Science Alliance* 1 (2). <https://doi.org/10.26508/lsa.201800054>.
- Feo, Salvatore, Daniela Arcuri, Eugenia Piddini, Rosa Passantino, et Agata Giallongo. 2000. « ENO1 Gene Product Binds to the C-Myc Promoter and Acts as a Transcriptional Repressor: Relationship with Myc Promoter-Binding Protein 1 (MBP-1) ». *FEBS Letters* 473 (1): 47-52. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01494-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01494-0).
- Fernandes, Denise C., Ana Heloisa O. Manoel, João Wosniak, et Francisco R. Laurindo. 2009. « Protein Disulfide Isomerase Overexpression in Vascular Smooth Muscle Cells Induces Spontaneous Preemptive NADPH Oxidase Activation and Nox1 mRNA Expression: Effects of Nitrosothiol Exposure ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 484 (2): 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.01.022>.
- Figard, Lauren, Liuliu Zheng, Natalie Biel, Zenghui Xue, Hasan Seede, Seth Coleman, Ido Golding, et Anna Marie Sokac. 2019. « Cofilin-Mediated Actin Stress Response Is Maladaptive in Heat-Stressed Embryos ». *Cell Reports* 26 (13): 3493-3501.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.092>.
- Franco-Martínez, Lorena, Silvia Martínez-Subiela, Damian Escribano, Sarah Schlosser, Katharina Nöbauer, Ebrahim Razzazi-Fazeli, Diego Romero, Jose Joaquin Cerón, et Asta Tvarijonaviciute. 2018. « Alterations in haemolymph proteome of *Mytilus galloprovincialis* mussel after an induced injury ». *Fish & Shellfish Immunology* 75: 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.038>.
- Franzellitti, Silvia, Fiorella Prada, Aldo Viarengo, et Elena Fabbri. 2020. « Evaluating Bivalve Cytoprotective Responses and Their Regulatory Pathways in a Climate Change Scenario ». *Science of The Total Environment* 720 (juin): 137733. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137733>.
- Fu, H., J. Coburn, et R. J. Collier. 1993. « The Eukaryotic Host Factor That Activates Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* Is a Member of the 14-3-3 Protein Family. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (6): 2320-24. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.6.2320>.
- Fu, WanTao, JuLin Zhang, ChangBo Zheng, Jing Liu, ZhongFu An, HongWen Liu, et Wei Zhang. 2013. « Molecular Cloning of Partial 14-3-3 Genes in the Marine Sponge *Hymeniacidon perleve* and

- Its Role in Differentiating Infectious and Non-Infectious Bacteria ». *Chinese Science Bulletin* 58 (7): 766-76. <https://doi.org/10.1007/s11434-012-5400-z>.
- Gad, S. C. 2014. « Zinc ». In *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, édité par Philip Wexler, 997-99. Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00962-3>.
- Gaitán-Espitia, Juan Diego, Julian F. Quintero-Galvis, Andres Mesas, et Guillermo D'Elía. 2016. « Mitogenomics of Southern Hemisphere Blue Mussels (Bivalvia: Pteriomorpha): Insights into the Evolutionary Characteristics of the *Mytilus edulis* Complex ». *Scientific Reports* 6 (1): 26853. <https://doi.org/10.1038/srep26853>.
- Gardino, Alexandra K., Stephen J. Smerdon, et Michael B. Yaffe. 2006. « Structural Determinants of 14-3-3 Binding Specificities and Regulation of Subcellular Localization of 14-3-3-Ligand Complexes: A Comparison of the X-Ray Crystal Structures of All Human 14-3-3 Isoforms ». *Seminars in Cancer Biology*, 14-3-3 Proteins in Cancer, 16 (3): 173-82. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.03.007>.
- Garric, Jeanne, Soizic Morin, et F. Vincent-Hubert. 2010. « Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage ». *Sciences Eaux & Territoires*, n° 1: 12-17. <https://doi.org/10.14758/SET-REVUE.2010.1.03>.
- Gasteiger, Elisabeth, Alexandre Gattiker, Christine Hoogland, Ivan Ivanyi, Ron D. Appel, et Amos Bairoch. 2003. « ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis ». *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3784-88. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>.
- Gelembiuk, Gregory W., Gemma E. May, et Carol Eunmi Lee. 2006. « Phylogeography and Systematics of Zebra Mussels and Related Species ». *Molecular Ecology* 15 (4): 1033-50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02816.x>.
- Gérard, Karin, Nicolas Bierne, Philippe Borsa, Anne Chenuil, Jean-Pierre Féral. 2008. « Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. mussels from Northern and Southern Hemispheres and strong genetic differentiation among southern populations ». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49 (1): 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.07.006>.
- Gerdol, Marco, Rebeca Moreira, Fernando Cruz, Jessica Gómez-Garrido, Anna Vlasova, Umberto Rosani, Paola Venier, Miguel A Naranjo-Ortiz, Maria Murgarella, Samuele Greco, Pablo Balseiro, André Corvelo, Leonor Frias, Marta Gut, Toni Gabaldón, Alberto Pallavicini, Carlos Canchaya, Beatriz Novoa, Tyler S Alioto, David Posada, Antonio Figueras. 2020. « Massive gene presence-absence variation shapes an open pan-genome in the Mediterranean mussel ». *Genome Biol.* 21(1):275. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02180-3>.
- Geret, Florence, Hélène Manduzio, R. Company, François Le Boulenger, Maria. J. Bebianno, et Jean-Michel Danger. 2004. « Molecular Cloning of Superoxide Dismutase (Cu/Zn-SOD) from Aquatic Molluscs ». *Marine Environmental Research*, Twelfth International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms, 58 (2): 619-23. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.052>.
- Gestwicki, Jason E., et Hao Shao. 2019. « Inhibitors and Chemical Probes for Molecular Chaperone Networks ». *Journal of Biological Chemistry* 294 (6): 2151-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M118.002813>.
- Ghazaei, Ciamak. 2017. « Role and Mechanism of the Hsp70 Molecular Chaperone Machines in Bacterial Pathogens ». *Journal of Medical Microbiology* 66 (3): 259-65. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000429>.
- Gillette, Thomas G., Brajesh Kumar, David Thompson, Clive A. Slaughter, et George N. DeMartino. 2008. « Differential Roles of the COOH Termini of AAA Subunits of PA700 (19 S Regulator) in Asymmetric Assembly and Activation of the 26 S Proteasome* ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (46): 31813-22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805935200>.
- Giribet, Gonzalo, et Ward Wheeler. 2005. « On Bivalve Phylogeny: A High-Level Analysis of the Bivalvia (Mollusca) Based on Combined Morphology and DNA Sequence Data ». *Invertebrate Biology* 121 (4): 271-324. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2002.tb00132.x>.
- Goldberg, Edward D. 1975. « The Mussel Watch — A First Step in Global Marine Monitoring ». *Marine Pollution Bulletin* 6 (7): 111. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(75\)90271-4](https://doi.org/10.1016/0025-326X(75)90271-4).

- Goldberg, Edward D., Vaughan T. Bowen, John W. Farrington, George Harvey, John H. Martin, Patrick L. Parker, Robert W. Risebrough, William Robertson, Eric Schneider, et Eric Gamble. 1978. « The Mussel Watch ». *Environmental Conservation* 5 (2): 101-25. <https://doi.org/10.1017/S0376892900005555>.
- Gómez-Mendikute, A, et M.P Cajaraville. 2003. « Comparative Effects of Cadmium, Copper, Paraquat and Benzo[a]Pyrene on the Actin Cytoskeleton and Production of Reactive Oxygen Species (ROS) in Mussel Haemocytes ». *Toxicology in Vitro* 17 (5-6): 539-46. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00093-6](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00093-6).
- Gonzalez, Patrice, et Fabien Pierron. 2015. « Chapter 8 - Omics in Aquatic Ecotoxicology: The Ultimate Response to Biological Questions? » In *Aquatic Ecotoxicology*, édité par Claude Amiard-Triquet, Jean-Claude Amiard, et Catherine Mouneyrac, 183-203. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800949-9.00008-5>.
- Gorman, Adrienne M., Sandra J. M. Healy, Richard Jäger, et Afshin Samali. 2012. « Stress Management at the ER: Regulators of ER Stress-Induced Apoptosis ». *Pharmacology & Therapeutics* 134 (3): 306-16. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.02.003>.
- Gosling, Elizabeth, éd. 2003. « An Introduction to Bivalves ». In *Bivalve Molluscs*, 1-6. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995532.ch1>.
- Green, Dannielle S., Thomas J. Colgan, Richard C. Thompson, et James C. Carolan. 2019. « Exposure to microplastics reduces attachment strength and alters the haemolymph proteome of blue mussels (*Mytilus edulis*) ». *Environmental Pollution* 246: 423-34. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.017>.
- Grossi, Serena, Gabriele Fenini, Tobias Kockmann, Paulina Hennig, Michela Di Filippo, et Hans-Dietmar Beer. 2020. « Inactivation of the Cytoprotective Major Vault Protein by Caspase-1 and -9 in Epithelial Cells during Apoptosis ». *Journal of Investigative Dermatology* 140 (7): 1335-1345.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.11.015>.
- Gzyl, Jarosław, Jagna Chmielowska-Bąk, Roman Przymusiński, et Edward A. Gwóźdź. 2015. « Cadmium affects microtubule organization and post-translational modifications of tubulin in seedlings of soybean (*Glycine max* L.) ». *Frontiers in Plant Science* 6. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00937>.
- Halanych, Kenneth M. 2016. « Lophotrochozoa, Diversification of ». *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, 405-408. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00272-9>.
- Hall, M. D., D. G. Levitt, et L. J. Banaszak. 1992. « Crystal Structure of *Escherichia coli* Malate Dehydrogenase. A Complex of the Apoenzyme and Citrate at 1.87 Å Resolution ». *Journal of Molecular Biology* 226 (3): 867-82. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90637-y](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90637-y).
- Hammack, Lindsay J., et Andrew R. Kusmierczyk. 2017. « Assembly of Proteasome Subunits into Non-Canonical Complexes in Vivo ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482 (1): 164-69. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.024>.
- Haszprunar, Gerhard, et Andreas Wanninger. 2012. « Molluscs ». *Current Biology* 22 (13): R510-14. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.039>.
- Hédouin, L., P. Bustamante, C. Churlaud, O. Pringault, R. Fichez, et M. Warnau. 2009. « Trends in Concentrations of Selected Metalloid and Metals in Two Bivalves from the Coral Reefs in the SW Lagoon of New Caledonia ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (2): 372-81. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.04.004>.
- Helmholz, Heike, Stephan Lassen, Christiane Ruhnau, Daniel Präfrock, Hans-Burkhard Erbslöh, et Andreas Prange. 2015. « Investigation on the Proteome Response of Transplanted Blue Mussel (*Mytilus* Sp.) during a Long-Term Exposure Experiment at Differently Impacted Field Stations in the German Bight (North Sea) ». *Marine Environmental Research* 110 (septembre): 69-80. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.07.021>.
- Hernroth, B., S. Baden, H. Tassidis, K. Hörnaeus, J. Guillemant, S. Bergström Lind, et J. Bergquist. 2016. « Impact of Ocean Acidification on Antimicrobial Activity in Gills of the Blue Mussel (*Mytilus edulis*) ». *Fish & Shellfish Immunology* 55 (août): 452-59. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.007>.

- Hetz, Claudio. 2012. « The Unfolded Protein Response: Controlling Cell Fate Decisions under ER Stress and Beyond ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (2): 89-102. <https://doi.org/10.1038/nrm3270>.
- IPCC, 2007: Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A. (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 104 pp.
- IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp
- IPCC, 2022: Climate Change 2022: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [P.R. Shukla, J. Skea, R. Slade, A. Al Khourdajie, R. van Diemen, D. McCollum, M. Pathak, S. Some, P. Vyas, R. Fradera, M. Belkacemi, A. Hasija, G. Lisboa, S. Luz, J. Malley, (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA. doi: 10.1017/9781009157926
- Hu, Wentao, Sarah Culloty, Grainne Darmody, Sharon Lynch, John Davenport, Sonia Ramirez-Garcia, Kenneth A. Dawson, Iseult Lynch, Julian Blasco, et David Sheehan. 2014a. « Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*: A Redox Proteomic Investigation ». *Chemosphere* 108 (août): 289-99. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.054>.
- Huang, Rongbing, Mengting Han, Liying Meng, et Xing Chen. 2018. « Transcriptome-Wide Discovery of Coding and Noncoding RNA-Binding Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (17): E3879-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718406115>.
- Ishikawa, Yoshihiro, Sergei Boudko, et Hans Peter Bächinger. 2015. « Ziploc-Ing the Structure: Triple Helix Formation Is Coordinated by Rough Endoplasmic Reticulum Resident PPIases ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Proline-directed Foldases: Cell Signaling Catalysts and Drug Targets, 1850 (10): 1983-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.12.024>.
- Ivanina, A. V., I. O. Kurochkin, L. Leamy, et I. M. Sokolova. 2012. « Effects of Temperature and Cadmium Exposure on the Mitochondria of Oysters (*Crassostrea virginica*) Exposed to Hypoxia and Subsequent Reoxygenation ». *Journal of Experimental Biology* 215 (18): 3142-54. <https://doi.org/10.1242/jeb.071357>.
- Izdebska, Magdalena, Wioletta Zielińska, Dariusz Grzanka, et Maciej Gagat. 2018. « The Role of Actin Dynamics and Actin-Binding Proteins Expression in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Its Association with Cancer Progression and Evaluation of Possible Therapeutic Targets ». *BioMed Research International* 2018: 4578373. <https://doi.org/10.1155/2018/4578373>.
- Jang, Ho Hee, Kyun Oh Lee, Yong Hun Chi, Bae Gyo Jung, Soo Kwon Park, Jin Ho Park, Jung Ro Lee, et al. 2004. « Two Enzymes in One: Two Yeast Peroxiredoxins Display Oxidative Stress-Dependent Switching from a Peroxidase to a Molecular Chaperone Function ». *Cell* 117 (5): 625-35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.002>.
- Janke, Carsten. 2014. « The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions ». *Journal of Cell Biology* 206 (4): 461-72. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406055>.
- Jeffery, Constance J. 2014. « An Introduction to Protein Moonlighting ». *Biochemical Society Transactions* 42: 5.
- Jeffery, Constance J. 2018. « Protein Moonlighting: What Is It, and Why Is It Important? » *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 373 (1738): 20160523. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0523>.
- Ji, Chenglong, Fei Li, Qing Wang, Jianmin Zhao, Zuodeng Sun, et Huifeng Wu. 2016. « An Integrated Proteomic and Metabolomic Study on the Gender-Specific Responses of Mussels *Mytilus galloprovincialis* to Tetrabromobisphenol A (TBBPA) ». *Chemosphere* 144 (février): 527-39. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.052>.
- Ji, Chenglong, Huifeng Wu, Lei Wei, Jianmin Zhao, Qing Wang, et Hongjian Lu. 2013. « Responses of *Mytilus galloprovincialis* to Bacterial Challenges by Metabolomics and Proteomics ». *Fish & Shellfish Immunology* 35 (2): 489-98. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.009>.

- Ji, Chenglong, Huifeng Wu, Lei Wei, Jianmin Zhao, et Junbao Yu. 2013. « Proteomic and Metabolomic Analysis Reveal Gender-Specific Responses of Mussel *Mytilus galloprovincialis* to 2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl Ether (BDE 47) ». *Aquatic Toxicology* 140-141 (septembre): 449-57. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.07.009>.
- Jing, Zongpan, Jiajia Gao, Jun Li, Fangfei Niu, Lusong Tian, Peng Nan, Yan Sun, et al. 2021. « Acetylation-Induced PCK Isoenzyme Transition Promotes Metabolic Adaption of Liver Cancer to Systemic Therapy ». *Cancer Letters* 519 (octobre): 46-62. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.06.016>.
- Johnson. 1996. « Geographic Spread of Exotic Species: Ecological Lessons and Opportunities from the Invasion of the Zebra Mussel *Dreissena polymorpha* ». *Biological Conservation* 78 (1-2): 23-33. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(96\)00015-8](https://doi.org/10.1016/0006-3207(96)00015-8).
- Karatayev, Alexander Y. 2015. « Zebra versus quagga mussels: a review of their spread, population dynamics, and ecosystem impacts | SpringerLink ». 2015. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10750-014-1901-x>.
- Kearney, P., et P. Thibault. 2003. « Bioinformatics meets proteomics — bridging the gap between mass spectrometry data analysis and cell biology ». *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* 01 (01): 183-200. <https://doi.org/10.1142/S021972000300023X>.
- Kerambrun, E., L. Delahaut, A. Geffard, et E. David. 2018. « Differentiation of Sympatric Zebra and Quagga Mussels in Ecotoxicological Studies: A Comparison of Morphometric Data, Gene Expression, and Body Metal Concentrations ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 154 (juin): 321-28. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.051>.
- Kerambrun, E., D. Rioult, L. Delahaut, L. Evariste, S. Pain-Devin, M. Auffret, A. Geffard, et E. David. 2016. « Variations in Gene Expression Levels in Four European Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*, Populations in Relation to Metal Bioaccumulation: A Field Study ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 134 (décembre): 53-63. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.018>.
- Kessner, Darren, Matt Chambers, Robert Burke, David Agus, et Parag Mallick. 2008. « ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development ». *Bioinformatics* 24 (21): 2534-36. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn323>.
- Klausen, Michael Schantz, Martin Closter Jespersen, Henrik Nielsen, Kamilla Kjærgaard Jensen, Vanessa Isabell Jurtz, Casper Kaae Sønderby, Morten Otto Alexander Sommer, et al. 2019. « NetSurfP-2.0: Improved Prediction of Protein Structural Features by Integrated Deep Learning ». *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 87 (6): 520-27. <https://doi.org/10.1002/prot.25674>.
- Kleppe, Rune, Aurora Martinez, Stein Ove Døskeland, et Jan Haavik. 2011. « The 14-3-3 Proteins in Regulation of Cellular Metabolism ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22 (7): 713-19. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.08.008>.
- Knetsch, Menno L. W, G. Paul H van Heusden, Herbert L Ennis, David R Shaw, Stefan J. P Epskamp, et B. Ewa Snaar-Jagalska. 1997. « Isolation of a *Dictyostelium discoideum* 14-3-3 Homologue1The Nucleotide Sequence Data Reported in This Paper Has Been Submitted to the EMBL/Genbank/DDBJ Data Base under the Accession Number X95568.1 ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1357 (2): 243-48. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(97\)00060-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(97)00060-8).
- Koletsy, A. J., M. W. Harding, et R. E. Handschumacher. 1986. « Cyclophilin: Distribution and Variant Properties in Normal and Neoplastic Tissues. » *The Journal of Immunology* 137 (3): 1054-59.
- Kong, Lawrence B., Amara C. Siva, Leonard H. Rome, et Phoebe L. Stewart. 1999. « Structure of the Vault, a Ubiquitous Cellular Component ». *Structure* 7 (4): 371-79. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80050-1](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80050-1).
- Kozlov, Guennadi, Olga Vavelyuk, Ovidiu Minailiuc, Denis Banville, Kalle Gehring, et Irena Ekiel. 2006. « Solution Structure of a Two-Repeat Fragment of Major Vault Protein ». *Journal of Molecular Biology* 356 (2): 444-52. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.064>.
- Kudryashov, Dmitri S., et Emil Reisler. 2013. « ATP and ADP Actin States ». *Biopolymers* 99 (4): 245-56. <https://doi.org/10.1002/bip.22155>.

- Kültz, Dietmar. 2005. « Molecular and Evolutionary Basis of the Cellular Stress Response ». *Annual Review of Physiology* 67: 225-57. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635>.
- Lacroix, Camille, Gaëlle Richard, Catherine Segueineau, Julien Guyomarch, Dario Moraga, et Michel Auffret. 2015. « Active and Passive Biomonitoring Suggest Metabolic Adaptation in Blue Mussels (*Mytilus* Spp.) Chronically Exposed to a Moderate Contamination in Brest Harbor (France) ». *Aquatic Toxicology* 162 (mai): 126-37. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.008>.
- Lafontaine, Yves de, François Gagné, Christian Blaise, Georges Costan, Pierre Gagnon, et H. M. Chan. 2000. « Biomarkers in Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*) for the Assessment and Monitoring of Water Quality of the St Lawrence River (Canada) ». *Aquatic Toxicology* 50 (1): 51-71. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00094-6).
- Lange, Philipp F., Pitter F. Huesgen, et Christopher M. Overall. 2012. « TopFIND 2.0—linking protein termini with proteolytic processing and modifications altering protein function ». *Nucleic Acids Research* 40 (D1): D351-61. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1025>.
- Langella, Olivier, Benoît Valot, Thierry Balliau, Mélisande Blein-Nicolas, Ludovic Bonhomme, et Michel Zivy. 2017. « XITandemPipeline: A Tool to Manage Sequence Redundancy for Protein Inference and Phosphosite Identification ». *Journal of Proteome Research* 16 (2): 494-503. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00632>.
- Larade, Kevin, et Kenneth B. Storey. 2002. « Chapter 3 - A Profile of the Metabolic Responses to Anoxia in Marine Invertebrates ». In *Cell and Molecular Response to Stress*, édité par K. B. Storey et J. M. Storey, 3:27-46. Sensing, Signaling and Cell Adaptation. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1568-1254\(02\)80005-5](https://doi.org/10.1016/S1568-1254(02)80005-5).
- Latorre-Muro, Pedro, Josue Baeza, Ramon Hurtado-Guerrero, Thomas Hicks, Ignacio Delso, Cristina Hernández-Ruiz, Adrian Velázquez-Campoy, et al. 2021. « Self-Acetylation at the Active Site of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PCK1) Controls Enzyme Activity ». *Journal of Biological Chemistry* 296 (janvier): 100205. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015103>.
- Le Guernic, Antoine, Alain Geffard, Frank Le Foll, et Mélissa Palos Ladeiro. 2020. « Comparison of Viability and Phagocytic Responses of Hemocytes Withdrawn from the Bivalves *Mytilus edulis* and *Dreissena polymorpha*, and Exposed to Human Parasitic Protozoa ». *International Journal for Parasitology* 50 (1): 75-83. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.10.005>.
- Le Guernic, Antoine, Alain Geffard, Damien Rioult, Aurélie Bigot-Clivot, Maxime Leprêtre, et Mélissa Palos Ladeiro. 2020. « Cellular and Molecular Complementary Immune Stress Markers for the Model Species *Dreissena polymorpha* ». *Fish & Shellfish Immunology* 107 (décembre): 452-62. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.10.027>.
- Lee, Stella Yu-Chien, Alina De La Mota-Peynado, et Jeroen Roelofs. 2011. « Loss of Rpt5 Protein Interactions with the Core Particle and Nas2 Protein Causes the Formation of Faulty Proteasomes That Are Inhibited by Ecm29 Protein ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (42): 36641-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.280875>.
- Lemer, Sarah, Vanessa L. González, Rüdiger Bieler, et Gonzalo Giribet. 2016. « Cementing mussels to oysters in the pteriomorphian tree: a phylogenomic approach ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283 (1833): 20160857. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0857>.
- Leprêtre, Maxime, Christine Almunia, Jean Armengaud, Antoine Le Guernic, Arnaud Salvador, Alain Geffard, et Mélissa Palos-Ladeiro. 2020. « Identification of Immune-Related Proteins of *Dreissena polymorpha* Hemocytes and Plasma Involved in Host-Microbe Interactions by Differential Proteomics ». *Scientific Reports* 10 (1): 6226. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63321-z>.
- Letendre, Julie, Myrielle Dupont-Rouzeyrol, Anne-Caroline Hanquet, Fabrice Durand, Hélène Budzinski, Philippe Chan, David Vaudry, et Béatrice Rocher. 2011. « Impact of Toxicant Exposure on the Proteomic Response to Intertidal Condition in *Mytilus edulis* ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 6 (4): 357-69. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2011.08.002>.

- Leung, Priscilla T. Y., Yu Wang, Sarah S. T. Mak, W. C. Ng, et Kenneth M. Y. Leung. 2011. « Differential Proteomic Responses in Hepatopancreas and Adductor Muscles of the Green-Lipped Mussel *Perna viridis* to Stresses Induced by Cadmium and Hydrogen Peroxide ». *Aquatic Toxicology* 105 (1): 49-61. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.010>.
- Lin, Weilin, Malte Bonin, Annett Boden, Robert Wieduwild, Priyanka Murawala, Martin Wermke, Helena Andrade, Martin Bornhäuser, et Yixin Zhang. 2019. « Peptidyl Prolyl Cis/Trans Isomerase Activity on the Cell Surface Correlates with Extracellular Matrix Development ». *Communications Biology* 2 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0315-8>.
- Liu, Hongbin, Haining Zhu, Daryl K. Eggers, Aram M. Nersissian, Kym F. Faull, Joy J. Goto, Jingyuan Ai, Joann Sanders-Loehr, Edith Butler Gralla, et Joan Selverstone Valentine. 2000. « Copper (2+) Binding to the Surface Residue Cysteine 111 of His46Arg Human Copper-Zinc Superoxide Dismutase, a Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Mutant ». *Biochemistry* 39 (28): 8125-32. <https://doi.org/10.1021/bi000846f>.
- Liu, Huihui, Jiong Wu, Mengshan Xu, et Jianyu He. 2016. « A Novel Biomarker for Marine Environmental Pollution of HSP90 from *Mytilus coruscus* ». *Marine Pollution Bulletin* 111 (1): 428-34. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.07.031>.
- Llauró, Aida, Pablo Guerra, Nerea Irigoyen, José F. Rodríguez, Núria Verdaguer, et Pedro J. de Pablo. 2014. « Mechanical Stability and Reversible Fracture of Vault Particles ». *Biophysical Journal* 106 (3): 687-95. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.12.035>.
- Lopez-Fanarraga, M., J. Avila, A. Guasch, M. Coll, et J. C. Zabala. 2001. « Review: Postchaperonin Tubulin Folding Cofactors and Their Role in Microtubule Dynamics ». *Journal of Structural Biology* 135 (2): 219-29. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2001.4386>.
- López-Pedrouso, M., Z. Varela, D. Franco, J. A. Fernández, et J. R. Aboal. 2020. « Can Proteomics Contribute to Biomonitoring of Aquatic Pollution? A Critical Review ». *Environmental Pollution* 267 (décembre): 115473. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115473>.
- Louis, Fanny, Simon Devin, Laure Giambérini, Marine Potet, Elise David, et Sandrine Pain-Devin. 2019. « Energy Allocation in Two Dreissenid Species under Metal Stress ». *Environmental Pollution* 245 (février): 889-97. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.079>.
- Luitfried, Salvini-Plawen. 2009. « Photoreception and the Polyphyletic Evolution of Photoreceptors (with Special Reference to Mollusca) ». *American Malacological Bulletin* 26 (janvier): 83-100. <https://doi.org/10.4003/006.026.0209>.
- Lundin, Victor F., Michel R. Leroux, et Peter C. Stirling. 2010. « Quality Control of Cytoskeletal Proteins and Human Disease ». *Trends in Biochemical Sciences* 35 (5): 288-97. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.12.007>.
- Mackie, G.L. 1991. « Biology of the Exotic Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*, in Relation to Native Bivalves and Its Potential Impact in Lake St. Clair ». *Hydrobiologia* 219 (1): 251-68. <https://doi.org/10.1007/BF00024759>.
- Mackintosh, Carol. 2004. « Dynamic Interactions between 14-3-3 Proteins and Phosphoproteins Regulate Diverse Cellular Processes ». *Biochemical Journal* 381 (2): 329-42. <https://doi.org/10.1042/BJ20031332>.
- Magiera, Maria M., Puja Singh, Sudarshan Gadadhar, et Carsten Janke. 2018. « Tubulin Posttranslational Modifications and Emerging Links to Human Disease ». *Cell* 173 (6): 1323-27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.018>.
- Magni, S., C. Della Torre, G. Garrone, A. D'Amato, C. C. Parenti, et A. Binelli. 2019. « First Evidence of Protein Modulation by Polystyrene Microplastics in a Freshwater Biological Model ». *Environmental Pollution* 250 (juillet): 407-15. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.088>.
- Magni, Stefano, Lara Nigro, Camilla Della Torre, et Andrea Binelli. 2021. « Characterization of Plastics and Their Ecotoxicological Effects in the Lambro River (N. Italy) ». *Journal of Hazardous Materials* 412 (juin): 125204. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125204>.
- Manduzio, Hélène, Tiphaine Monsinjon, Béatrice Rocher, François Le Boulenger, et Camille Galap. 2003. « Characterization of an Inducible Isoform of the Cu/Zn Superoxide Dismutase in the

- Blue Mussel *Mytilus edulis* ». *Aquatic Toxicology* 64 (1): 73-83. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00026-2](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00026-2).
- Marcus, Katrin, et Thierry Rabilloud. 2020. « How Do the Different Proteomic Strategies Cope with the Complexity of Biological Regulations in a Multi-Omic World? Critical Appraisal and Suggestions for Improvements ». *Proteomes* 8 (3): 23. <https://doi.org/10.3390/proteomes8030023>.
- Marescaux, Jonathan, Daniel Molloy, Giamberini L, et Albrecht K. 2012. « First records of the quagga mussel, *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897), in the Meuse River within France ». *BiolInvasions Records* 1 (octobre): 273-76.
- Maria, V. L., T. Gomes, L. Barreira, et M. J. Bebianno. 2013. « Impact of Benzo(a)Pyrene, Cu and Their Mixture on the Proteomic Response of *Mytilus galloprovincialis* ». *Aquatic Toxicology* 144-145 (novembre): 284-95. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.009>.
- McCarty, L. S., M. Power, et K. R. Munkittrick. 2002. « Bioindicators Versus Biomarkers in Ecological Risk Assessment ». *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8 (1): 159-64. <https://doi.org/10.1080/20028091056791>.
- Meistertzheim, Anne-Leila, Arnaud Tanguy, Dario Moraga, et Marie-Thérèse Thébault. 2007. « Identification of Differentially Expressed Genes of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Exposed to Prolonged Thermal Stress ». *The FEBS Journal* 274 (24): 6392-6402. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06156.x>.
- Méndez-Lucas, Andrés, Petra Hyroššová, Laura Novellasdemunt, Francesc Viñals, et Jose C. Perales. 2014. « Mitochondrial Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK-M) Is a Pro-Survival, Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Response Gene Involved in Tumor Cell Adaptation to Nutrient Availability ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (32): 22090-102. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.566927>.
- Milan, Massimo, Marianna Pauletto, Tomaso Patarnello, Luca Bargelloni, Maria Gabriella Marin, et Valerio Matozzo. 2013. « Gene Transcription and Biomarker Responses in the Clam *Ruditapes philippinarum* after Exposure to Ibuprofen ». *Aquatic Toxicology* 126 (janvier): 17-29. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.10.007>.
- Milanese, Chiara, Cíntia R. Bombardieri, Sara Sepe, Sander Barnhoorn, César Payán-Goméz, Donatella Caruso, Matteo Audano, et al. 2019. « DNA Damage and Transcription Stress Cause ATP-Mediated Redesign of Metabolism and Potentiation of Anti-Oxidant Buffering ». *Nature Communications* 10 (1): 4887. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12640-5>.
- Milani, Pamela, Stella Gagliardi, Emanuela Cova, et Cristina Cereda. 2011. « SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS ». *Neurology Research International* 2011 (avril): e458427. <https://doi.org/10.1155/2011/458427>.
- Milinkovitch, Thomas, Olivier Geffard, Alain Geffard, Catherine Mouneyrac, Arnaud Chaumot, Benoit Xuereb, Cédric Fisson, et al. 2019. « Biomarkers as Tools for Monitoring within the Water Framework Directive Context: Concept, Opinions and Advancement of Expertise ». *Environmental Science and Pollution Research* 26 (32): 32759-63. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06434-x>.
- Minárik, P., N. Tomásková, M. Kollárová, et M. Antalík. 2002. « Malate Dehydrogenases--Structure and Function ». *General Physiology and Biophysics* 21 (3): 257-65.
- Moon, Jeong Chan, Young-Sool Hah, Woe Yeon Kim, Bae Gyo Jung, Ho Hee Jang, Jung Ro Lee, Sun Young Kim, et al. 2005. « Oxidative Stress-Dependent Structural and Functional Switching of a Human 2-Cys Peroxiredoxin Isotype II That Enhances HeLa Cell Resistance to H₂O₂-Induced Cell Death ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (31): 28775-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505362200>.
- Mundkur, B. 1949. « Evidence Excluding Mutations, Polysomy, and Polyploidy as Possible Causes of Non-Mendelian Segregations in *Saccharomyces* ». <https://doi.org/10.2307/2394394>.
- Nguyen, Thao V., et Andrea C. Alfaro. 2020. « Applications of omics to investigate responses of bivalve haemocytes to pathogen infections and environmental stress ». *Aquaculture* 518: 734488. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734488>.

- Obsilova, Veronika, Jaroslav Vecer, Petr Herman, Anna Pabianova, Miroslav Sulc, Jan Teisinger, Evzen Boura, et Tomas Obsil. 2005. « 14-3-3 Protein Interacts with Nuclear Localization Sequence of Forkhead Transcription Factor FoxO4 ». *Biochemistry* 44 (34): 11608-17. <https://doi.org/10.1021/bi050618r>.
- Office Français de la Biodiversité. Portail Technique, le site pour les professionnels de la biodiversité, <https://professionnels.ofb.fr/fr/node/1474>, consulté le 01 juillet 2022
- Oliveira, Isabel B., Ksenia J. Groh, Julita Stadnicka-Michalak, René Schönenberger, Ricardo Beiras, Carlos M. Barroso, Katherine H. Langford, Kevin V. Thomas, et Marc J. -F. Suter. 2016. « Tralopyril Bioconcentration and Effects on the Gill Proteome of the Mediterranean Mussel *Mytilus galloprovincialis* ». *Aquatic Toxicology* 177 (août): 198-210. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.026>.
- Olsson, Björne, Brian P. Bradley, Michael Gilek, Olof Reimer, Jenn L. Shepard, et Michael Tedengren. 2004. « Physiological and Proteomic Responses in *Mytilus edulis* Exposed to PCBs and PAHs Extracted from Baltic Sea Sediments ». In *Biology of the Baltic Sea*, édité par Hans Kautsky et Pauli Snoeijs, 15-27. Developments in Hydrobiology. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0920-0_2.
- Orbach, Ron, et Jonathon Howard. 2019. « The Dynamic and Structural Properties of Axonemal Tubulins Support the High Length Stability of Cilia ». *Nature Communications* 10 (1): 1838. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09779-6>.
- Orlova, Marina I., Thomas W. Therriault, Pavel I. Antonov, et Gregory Kh. Shcherbina. 2005. « Invasion Ecology of Quagga Mussels (*Dreissena rostriformis bugensis*): A Review of Evolutionary and Phylogenetic Impacts ». *Aquatic Ecology* 39 (4): 401-18. <https://doi.org/10.1007/s10452-005-9010-6>.
- Owen, Jennifer R., Ceri A. Morris, Beate Nicolaus, John L. Harwood, et Peter Kille. 2012. « Induction of Expression of a 14-3-3 Gene in Response to Copper Exposure in the Marine Alga, *Fucus vesiculosus* ». *Ecotoxicology* 21 (1): 124-38. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0772-4>.
- Pain-Devin, S., C. Cossu-Leguille, A. Geffard, L. Giambérini, T. Jouenne, L. Minguez, B. Naudin, et al. 2014. « Towards a Better Understanding of Biomarker Response in Field Survey: A Case Study in Eight Populations of Zebra Mussels ». *Aquatic Toxicology* 155 (octobre): 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.008>.
- Paludo, Gabriela Prado, Karina Rodrigues Lorenzatto, Diego Bonatto, et Henrique Bunselmeyer Ferreira. 2015. « Systems Biology Approach Reveals Possible Evolutionarily Conserved Moonlighting Functions for Enolase ». *Computational Biology and Chemistry* 58 (octobre): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2015.04.010>.
- Parakh, Sonam, et Julie D. Atkin. 2015. « Novel roles for protein disulphide isomerase in disease states: a double edged sword? » *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2015.00030>.
- Park, Gun Wook, Heeyoun Hwang, Kwang Hoe Kim, Ju Yeon Lee, Hyun Kyoung Lee, Ji Yeong Park, Eun Sun Ji, et al. 2016. « Integrated Proteomic Pipeline Using Multiple Search Engines for a Proteogenomic Study with a Controlled Protein False Discovery Rate ». *Journal of Proteome Research* 15 (11): 4082-90. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00376>.
- Park, Hyun, In-Young Ahn, Hakjun Kim, Jina Cheon, et Meesun Kim. 2008. « Analysis of ESTs and Expression of Two Peroxiredoxins in the Thermally Stressed Antarctic Bivalve *Laternula elliptica* ». *Fish & Shellfish Immunology* 25 (5): 550-59. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.07.017>.
- Pecheur, Marie Le, Emmanuel Bourdon, Evelyne Paly, Luc Farout, Bertrand Friguet, et Jacqueline London. 2005. « Oxidized SOD1 Alters Proteasome Activities in Vitro and in the Cortex of SOD1 Overexpressing Mice ». *FEBS Letters* 579 (17): 3613-18. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.048>.
- Péden, R., J. Letendre, B. Rocher, F. Durand, F. Le Foll, P. Chan, D. Vaudry, et F. Bultelle. 2014. « Impact of Heat Stress on *Mytilus edulis*: Contaminants Affect Survival and HSP 70 Proteoform Expression ». *Journal of Xenobiotics* 4 (2). <https://doi.org/10.4081/xeno.2014.4892>.

- Péden, Romain, Pascal Poupin, Bénédicte Sohm, Justine Flayac, Laure Giambérini, Christophe Klopp, Fanny Louis, et al. 2019. « Environmental Transcriptomes of Invasive *Dreissena*, a Model Species in Ecotoxicology and Invasion Biology ». *Scientific Data* 6 (1): 234. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0252-x>.
- Péden, Romain, Béatrice Rocher, Philippe Chan, David Vaudry, Agnès Poret, Stéphanie Olivier, Frank Le Foll, et Florence Bultelle. 2016. « Consequences of Acclimation on the Resistance to Acute Thermal Stress: Proteomic Focus on Mussels from Pristine Site ». *Marine Environmental Research* 121 (octobre): 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.02.006>.
- Pedriali, Alessandra, Consuelo Riva, Marco Parolini, Simone Cristoni, David Sheehan, et Andrea Binelli. 2013. « A Redox Proteomic Investigation of Oxidative Stress Caused by Benzoylcegonine in the Freshwater Bivalve *Dreissena polymorpha* ». *Drug Testing and Analysis* 5 (8): 646-56. <https://doi.org/10.1002/dta.1409>.
- Pennington, K. L., T. Y. Chan, M. P. Torres, et J. L. Andersen. 2018. « The Dynamic and Stress-Adaptive Signaling Hub of 14-3-3: Emerging Mechanisms of Regulation and Context-Dependent Protein-Protein Interactions ». *Oncogene* 37 (42): 5587-5604. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0348-3>.
- Perry, J.J.P., D.S. Shin, E.D. Getzoff, et J.A. Tainer. 2010. « The structural biochemistry of the superoxide dismutases ». *Biochimica et biophysica acta* 1804 (2): 245-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.004>.
- Petrak, Jiri, Robert Ivanek, Ondrej Toman, Radek Cmejla, Jana Cmejlova, Daniel Vyoral, Jan Zivny, et Christopher D. Vulpe. 2008. « Déjà vu in Proteomics. A Hit Parade of Repeatedly Identified Differentially Expressed Proteins ». *PROTEOMICS* 8 (9): 1744-49. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700919>.
- Peyer, Suzanne M., John C. Hermanson, et Carol Eunmi Lee. 2010. « Developmental plasticity of shell morphology of quagga mussels from shallow and deep-water habitats of the Great Lakes ». *Journal of Experimental Biology* 213 (15): 2602-9. <https://doi.org/10.1242/jeb.042549>.
- Philpott, C C, R D Klausner, et T A Rouault. 1994. « The bifunctional iron-responsive element binding protein/cytosolic aconitase: the role of active-site residues in ligand binding and regulation. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (15): 7321-25.
- Piano, Annamaria. 2004. « Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. » <https://doi.org/10.1379/483.1>.
- Ponstingl, Hannes, et Janet M. Thornton. 2003. « Proteomics: The Protein Complement of the Genome ». *The Biochemist* 25 (1): 7-9. <https://doi.org/10.1042/BIO02501007>.
- Poot, Stefanie A.H. de, Geng Tian, et Daniel Finley. 2017. « Meddling with fate: the proteasomal deubiquitinating enzymes ». *Journal of molecular biology* 429 (22): 3525-45. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.09.015>.
- Prié, Vincent, et Jean-François Fruget. 2017. « Heading South: New Records of the Invasive Quagga Mussel *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) in France and Further Perspectives ». *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, n° 418: 37. <https://doi.org/10.1051/kmae/2017023>.
- Rawlings, Neil D, Alan J Barrett, Paul D Thomas, Xiaosong Huang, Alex Bateman, et Robert D Finn. 2018. « The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database ». *Nucleic Acids Research* 46 (D1): D624-32. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>.
- Regoli, Francesco, David Pellegrini, Anna Maria Cicero, Marco Nigro, Maura Benedetti, Stefania Gorbi, Daniele Fattorini, et al. 2014. « A Multidisciplinary Weight of Evidence Approach for Environmental Risk Assessment at the Costa Concordia Wreck: Integrative Indices from Mussel Watch ». *Marine Environmental Research, Pollutant Responses in Marine Organisms" (PRIMO17)*, 96 (mai): 92-104. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.09.016>.

- Ribeiro, Diogo M, Galadriel Briere, Benoit Bely, Lionel Spinelli, et Christine Brun. 2019. « MoonDB 2.0: an updated database of extreme multifunctional and moonlighting proteins ». *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D398-402. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1039>.
- Ritossa, F. 1962. « A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in *Drosophila* ». *Experientia* 18 (12): 571-73. <https://doi.org/10.1007/BF02172188>.
- Riva, C., et A. Binelli. 2014. « Analysis of the *Dreissena polymorpha* Gill Proteome Following Exposure to Dioxin-like PCBs: Mechanism of Action and the Role of Gender ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 9 (mars): 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2013.08.005>.
- Riva, Consuelo, Andrea Binelli, Francesco Rusconi, Graziano Colombo, Alessandra Pedriali, Renata Zippel, et Alfredo Provini. 2011. « A Proteomic Study Using Zebra Mussels (*D. polymorpha*) Exposed to Benzo(α)Pyrene: The Role of Gender and Exposure Concentrations ». *Aquatic Toxicology* 104 (1): 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.03.008>.
- Riva, Consuelo, Simone Cristoni, et Andrea Binelli. 2012. « Effects of Triclosan in the Freshwater Mussel *Dreissena polymorpha*: A Proteomic Investigation ». *Aquatic Toxicology* 118-119 (août): 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.03.013>.
- Riviere, Guillaume, Christophe Klopp, Nabihoudine Ibouniyamine, Arnaud Huvet, Pierre Boudry, et Pascal Favrel. 2015. « GigaTON: an extensive publicly searchable database providing a new reference transcriptome in the pacific oyster *Crassostrea gigas* ». *BMC Bioinformatics* 16 (décembre). <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0833-4>.
- Rocher, Béatrice, Elise David, Arnaud Tanguy, Aimie Le Saux, Lauris Evariste, Fanny Louis, Laurence Delahaut, et al. 2020. « Characterization of Cu/Zn-SODs in Sympatric Species: A Comparison of Zebra and Quagga Mussels ». *Journal of Great Lakes Research* 46 (6): 1783-90. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2020.09.012>.
- Romero, Mónica R., Andrés Pérez-Figueroa, Mónica Carrera, Willie J. Swanson, David O. F. Skibinski, et Angel P. Diz. 2019. « RNA-Seq Coupled to Proteomic Analysis Reveals High Sperm Proteome Variation between Two Closely Related Marine Mussel Species ». *Journal of Proteomics* 192 (février): 169-87. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.08.020>.
- Sabirov, M. A. 2014. « Modeling of the Temporal and Local Spatial Structure Variability in Mixed Settlements of *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus* ». *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 50 (1): 91-93. <https://doi.org/10.1134/S0022093014010137>.
- Sakata, Eri, Markus R. Eisele, et Wolfgang Baumeister. 2021. « Molecular and Cellular Dynamics of the 26S Proteasome ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1869 (3): 140583. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140583>.
- Salazar, Michael H., et Sandra M. Salazar. 1997. « Using Caged Bivalves to Characterize Exposure and Effects Associated with Pulp and Paper Mill Effluents ». *Water Science and Technology, Forest Industry Wastewaters V*, 35 (2): 213-20. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(96\)00933-X](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(96)00933-X).
- Salvini-Plawen, Luitfried v. 2021. « Mollusk | Animal Phylum | Britannica ». 16 mars 2021. <https://www.britannica.com/animal/mollusk>.
- Samadi, Sarah, Erwan Quéméré, Julien Lorion, Annie Tillier, Rudo Cosel, Philippe Lopez, Corinne Cruaud, Arnaud Couloux, et Marie-Catherine Boisselier. 2007. « Molecular phylogeny in mytilids supports the wooden steps to deep-sea vents hypothesis ». *Comptes rendus biologies* 330 (juin): 446-56. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2007.04.001>.
- Sanchez, W., et J.-M. Porcher. 2009. « Utilisation des biomarqueurs pour la caractérisation de l'état écotoxicologique des masses d'eau ». *Techniques Sciences Méthodes*, n° 5: 29-38. <https://doi.org/10.1051/tsm/200905029>.
- Sánchez-Marín, Paula, Leticia Vidal-Liñán, Laura Emilia Fernández-González, Rosa Montes, Rosario Rodil, José Benito Quintana, Mónica Carrera, Jesús Mateos, Angel P. Diz, et Ricardo Beiras. 2021. « Proteomic Analysis and Biochemical Alterations in Marine Mussel Gills after Exposure to the Organophosphate Flame Retardant TDCPP ». *Aquatic Toxicology* 230 (janvier): 105688. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105688>.

- Schuster, Romina, Jennifer S. Strehse, Aino Ahvo, Raisa Turja, Edmund Maser, Ulf Bickmeyer, Kari K. Lehtonen, et Matthias Brenner. 2021. « Exposure to Dissolved TNT Causes Multilevel Biological Effects in Baltic Mussels (*Mytilus spp.*) ». *Marine Environmental Research* 167 (mai): 105264. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105264>.
- Screaton, Robert A., Michael D. Conkright, Yoshiko Katoh, Jennifer L. Best, Gianluca Canettieri, Shawn Jeffries, Ernesto Guzman, et al. 2004. « The CREB Coactivator TORC2 Functions as a Calcium- and CAMP-Sensitive Coincidence Detector ». *Cell* 119 (1): 61-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.015>.
- Sharma, Prashant P., Vanessa L. González, Gisele Y. Kawauchi, Sónia C. S. Andrade, Alejandra Guzmán, Timothy M. Collins, Emily A. Glover, et al. 2012. « Phylogenetic Analysis of Four Nuclear Protein-Encoding Genes Largely Corroborates the Traditional Classification of Bivalvia (Mollusca) ». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65 (1): 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.05.025>.
- Sigwart, Julia D., David R. Lindberg, Chong Chen, et Jin Sun. 2021. « Molluscan phylogenomics requires strategically selected genomes ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 376 (1825): 20200161. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0161>.
- Smits, M., S. Artigaud, B. Bernay, V. Pichereau, L. Bargelloni, et C. Paillard. 2020. « A Proteomic Study of Resistance to Brown Ring Disease in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum* ». *Fish & Shellfish Immunology* 99 (avril): 641-53. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.002>.
- Sokolova, I. M. 2013. « Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors ». *Integrative and Comparative Biology* 53 (4): 597-608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>.
- Sokolova, Inna M., Markus Frederich, Rita Bagwe, Gisela Lannig, et Alexey A. Sukhotin. 2012. « Energy Homeostasis as an Integrative Tool for Assessing Limits of Environmental Stress Tolerance in Aquatic Invertebrates ». *Marine Environmental Research* 79 (août): 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>.
- Song, Qinqin, Pengfei Zheng, Liguang Qiu, Xiu Jiang, Hongwei Zhao, Hailong Zhou, Qian Han, et Xiaoping Diao. 2016. « Toxic Effects of Male *Perna viridis* Gonad Exposed to BaP, DDT and Their Mixture: A Metabolomic and Proteomic Study of the Underlying Mechanism ». *Toxicology Letters* 240 (1): 185-95. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.10.031>.
- Spratt, B. G., et A. B. Pardee. 1975. « Penicillin-Binding Proteins and Cell Shape in *E. Coli* ». *Nature* 254 (5500): 516-17. <https://doi.org/10.1038/254516a0>.
- Stefano, Luisa, Gabriella Racchetti, Fabio Bianco, Nadia Passini, Radhey S. Gupta, Paola Panina Bordignon, et Jacopo Meldolesi. 2009. « The Surface-Exposed Chaperone, Hsp60, Is an Agonist of the Microglial TREM2 Receptor ». *Journal of Neurochemistry* 110 (1): 284-94. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06130.x>.
- Steiner, Elisabeth, Klaus Holzmann, Christine Pirker, Leonilla Elbling, Michael Micksche, Hedwig Sutterlüty, et Walter Berger. 2006. « The Major Vault Protein Is Responsive to and Interferes with Interferon- γ -Mediated STAT1 Signals ». *Journal of Cell Science* 119 (3): 459-69. <https://doi.org/10.1242/jcs.02773>.
- Stepien, Carol A., Allyson N Hubers, et Jennifer L Skidmore. 1999. « Diagnostic Genetic Markers and Evolutionary Relationships among Invasive Dreissenoid and Corbiculoid Bivalves in North America: Phylogenetic Signal from Mitochondrial 16S rDNA ». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13 (1): 31-49. <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0666>.
- Stewart, Phoebe L., Miriam Makabi, Jennifer Lang, Carrie Dickey-Sims, Anthony J. Robertson, James A. Coffman, et Kathy A. Suprenant. 2005. « Sea urchin vault structure, composition, and differential localization during development ». *BMC Developmental Biology* 5 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-5-3>.
- Sukhotin, A. A., P. P. Strelkov, N. V. Maximovich, et H. Hummel. 2007a. « Growth and Longevity of *Mytilus edulis* (L.) from Northeast Europe ». *Marine Biology Research* 3 (3): 155-67. <https://doi.org/10.1080/17451000701364869>.

- Szklarczyk, Damian, Annika L Gable, David Lyon, Alexander Junge, Stefan Wyder, Jaime Huerta-Cepas, Milan Simonovic, et al. 2019. « STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets ». *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D607-13. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>.
- Teng, Jia, Jianmin Zhao, Xiaopeng Zhu, Encui Shan, Chen Zhang, Wenjing Zhang, et Qing Wang. 2021. « Toxic Effects of Exposure to Microplastics with Environmentally Relevant Shapes and Concentrations: Accumulation, Energy Metabolism and Tissue Damage in Oyster *Crassostrea gigas* ». *Environmental Pollution* 269 (janvier): 116169. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116169>.
- Terman, Jonathan R, et Anna Kashina. 2013. « Post-Translational Modification and Regulation of Actin ». *Current Opinion in Cell Biology*, Cell architecture, 25 (1): 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.10.009>.
- Therriault, Thomas W, Margaret F Docker, Marina I Orlova, Daniel D Heath, et Hugh J MacIsaac. 2004. « Molecular Resolution of the Family Dreissenidae (Mollusca: Bivalvia) with Emphasis on Ponto-Caspian Species, Including First Report of *Mytilopsis leucophaeata* in the Black Sea Basin ». *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11.
- Ti, Shih-Chieh, Gregory M. Alushin, et Tarun M. Kapoor. 2018. « Human β -Tubulin Isoforms Can Regulate Microtubule Protofilament Number and Stability ». *Developmental Cell* 47 (2): 175-190.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.08.014>.
- Tobke, J sica, Erica Giarratano, Alejandro Ortiz, Carla Garrido, Mariana Serra, Mónica N. Gil, et Jorge M. Navarro. 2021. « Chitosan performance during Paralytic Shellfish Toxins (PST) depuration of *Mytilus chilensis* exposed to *Alexandrium catenella* ». *Toxicon* 195: 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.03.008>.
- Toker, Alex, Lynda A. Sellers, Bob Amess, Yasmina Patel, Alan Harris, et Alastair Aitken. 1992. « Multiple Isoforms of a Protein Kinase C Inhibitor (KCIP-1/14-3-3) from Sheep Brain ». *European Journal of Biochemistry* 206 (2): 453-61. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16946.x>.
- Tomanek, Lars. 2012. « Environmental Proteomics of the Mussel *Mytilus*: Implications for Tolerance to Stress and Change in Limits of Biogeographic Ranges in Response to Climate Change ». *Integrative and Comparative Biology* 52 (5): 648-64. <https://doi.org/10.1093/icb/ics114>.
- Tomanek, Lars, et Marcus J. Zuzow. 2010. « The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress ». *Journal of Experimental Biology* 213 (20): 3559-74. <https://doi.org/10.1242/jeb.041228>.
- Tomanek, Lars, Marcus J. Zuzow, Lauren Hitt, Loredana Serafini, et Jacob J. Valenzuela. 2012. « Proteomics of Hyposaline Stress in Blue Mussel Congeners (Genus *Mytilus*): Implications for Biogeographic Range Limits in Response to Climate Change ». *Journal of Experimental Biology*, janvier, jeb.076448. <https://doi.org/10.1242/jeb.076448>.
- Torossian, Jessica L., Kristen E. Hosek, Sarah C. Donelan, Geoffrey C. Trussell, Brian S. Helmuth, et Mackenzie L. Zippay. 2020. « Physiological and Biochemical Responses to Acute Environmental Stress and Predation Risk in the Blue Mussel, *Mytilus edulis* ». *Journal of Sea Research* 159 (avril): 101891. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2020.101891>.
- Trevisan, Rafael, Danielle Ferraz Mello, Marcela Uliano-Silva, Gabriel Delapiedra, Miriam Arl, et Alcir Luiz Dafre. 2014. « The Biological Importance of Glutathione Peroxidase and Peroxiredoxin Backup Systems in Bivalves during Peroxide Exposure ». *Marine Environmental Research* 101 (octobre): 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.09.004>.
- Tsang, Chi Kwan, Yuan Liu, Janice Thomas, Yanjie Zhang, et X. F. S. Zheng. 2014. « Superoxide Dismutase 1 Acts as a Nuclear Transcription Factor to Regulate Oxidative Stress Resistance ». *Nature Communications* 5 (1): 3446. <https://doi.org/10.1038/ncomms4446>.
- Ulrich, Paul N., et Adam G. Marsh. 2006. « Interindividual variation of malate dehydrogenase activity in the oyster *Crassostrea virginica* ». *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 39 (4): 293-306. <https://doi.org/10.1080/10236240601005090>.

- Ünal, Can M., et Michael Steinert. 2014. « Microbial Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerases (PPLases): Virulence Factors and Potential Alternative Drug Targets ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 78 (3): 544-71. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-14>.
- Vaate, Abraham bij de, et Jean-Nicolas Beisel. 2011. « Range Expansion of the Quagga Mussel *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) in Western Europe: First Observation from France ». *Aquatic Invasions* 6: S71-74. <https://doi.org/10.3391/ai.2011.6.S1.016>
- Vallin, Josefine, et Julie Grantham. 2019. « The Role of the Molecular Chaperone CCT in Protein Folding and Mediation of Cytoskeleton-Associated Processes: Implications for Cancer Cell Biology ». *Cell Stress and Chaperones* 24 (1): 17-27. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0949-3>.
- Vanderploeg, Henry A, Thomas F Nalepa, David J Jude, Edward L Mills, Kristen T Holeck, James R Liebig, Igor A Grigorovich, et Henn Ojaveer. 2002. « Dispersal and Emerging Ecological Impacts of Ponto-Caspian Species in the Laurentian Great Lakes ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59 (7): 1209-28. <https://doi.org/10.1139/f02-087>.
- Varotto, Laura, Stefania Domeneghetti, Umberto Rosani, Chiara Manfrin, Miren P. Cajaraville, Stefano Raccanelli, Alberto Pallavicini, et Paola Venier. 2013. « DNA Damage and Transcriptional Changes in the Gills of *Mytilus galloprovincialis* Exposed to Nanomolar Doses of Combined Metal Salts (Cd, Cu, Hg) ». *PLoS ONE* 8 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054602>.
- Vasquez, M. Christina, Daniela A. Martinez, et Lars Tomanek. 2020. « Multiple Stressor Responses Are Regulated by Sirtuins in *Mytilus* Congeners ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 246 (août): 110719. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110719>.
- Verdier-Pinard, Pascal, Eddy Pasquier, Hui Xiao, Berta Burd, Claude Villard, Daniel Lafitte, Leah M. Miller, Ruth H. Angeletti, Susan Band Horwitz, et Diane Braguer. 2009. « Tubulin Proteomics: Towards Breaking the Code ». *Analytical Biochemistry* 384 (2): 197-206. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.09.020>.
- Verma, Rati, L. Aravind, Robert Oania, W. Hayes McDonald, John R. Yates, Eugene V. Koonin, et Raymond J. Deshaies. 2002. « Role of Rpn11 Metalloprotease in Deubiquitination and Degradation by the 26S Proteasome ». *Science (New York, N.Y.)* 298 (5593): 611-15. <https://doi.org/10.1126/science.1075898>.
- Viarengo, A., F. Dondero, D. M. Pampanin, R. Fabbri, E. Poggi, M. Malizia, C. Bolognesi, E. Perrone, E. Gollo, et G. P. Cossa. 2007. « A Biomonitoring Study Assessing the Residual Biological Effects of Pollution Caused by the HAVEN Wreck on Marine Organisms in the Ligurian Sea (Italy) ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53 (4): 607-16. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0209-2>.
- Victor, Paul, Dronamraju Sarada, et Kunka Mohanram Ramkumar. 2021. « Crosstalk between Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: Focus on Protein Disulfide Isomerase and Endoplasmic Reticulum Oxidase 1 ». *European Journal of Pharmacology* 892 (février): 173749. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173749>.
- Wanamaker, Alan D., Jan Heinemeier, James D. Scourse, Christopher A. Richardson, Paul G. Butler, Jón Eiríksson, et Karen Luise Knudsen. 2008. « Very Long-Lived Mollusks Confirm 17th Century AD Tephra-Based Radiocarbon Reservoir Ages for North Icelandic Shelf Waters ». *Radiocarbon* 50 (3): 399-412. <https://doi.org/10.1017/S0033822200053510>.
- Wanninger, Andreas, et Tim Wollesen. 2019. « The Evolution of Molluscs ». *Biological Reviews* 94 (1): 102-15. <https://doi.org/10.1111/brv.12439>.
- Wasinger, Valerie C., Stuart J. Cordwell, Anne Cerpa-Poljak, Jun X. Yan, Andrew A. Gooley, Marc R. Wilkins, Mark W. Duncan, Ray Harris, Keith L. Williams, et Ian Humphery-Smith. 1995. « Progress with Gene-Product Mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium* ». *ELECTROPHORESIS* 16 (1): 1090-94. <https://doi.org/10.1002/elps.11501601185>.
- Wawrzyniak-Wydrowska, Brygida, Teresa Radziejewska, Anna Skrzypacz, et Adam Woźniczka. 2019. « Two Non-indigenous Dreissenids (*Dreissena polymorpha* and *D. rostriformis bugensis*) in a Southern Baltic Coastal Lagoon: Variability in Populations of the "Old" and a "New" Immigrant ». *Frontiers in Marine Science* 6: 76. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00076>.

- Wei, Lei, Qing Wang, Huifeng Wu, Chenglong Ji, et Jianmin Zhao. 2015. « Proteomic and Metabolomic Responses of Pacific Oyster *Crassostrea gigas* to Elevated PCO₂ Exposure ». *Journal of Proteomics* 112 (janvier): 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.08.010>.
- Wenne, R., L. Bach, M. Zbawicka, J. Strand, et J. H. McDonald. 2016. « A First Report on Coexistence and Hybridization of *Mytilus trossulus* and *M. edulis* Mussels in Greenland ». *Polar Biology* 39 (2): 343-55. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1785-x>.
- Wieme, Roger Jozef. 1974. « Assay after Electrophoretic Separation ». In *Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)*, édité par Hans Ulrich Bergmeyer, 618-23. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50021-9>.
- Williams, Robert J. 1970. « Freezing Tolerance in *Mytilus edulis* ». *Comparative Biochemistry and Physiology* 35 (1): 145-61. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(70\)90918-7](https://doi.org/10.1016/0010-406X(70)90918-7).
- Willyard, Cassandra. 2018. « New Human Gene Tally Reignites Debate ». *Nature* 558 (7710): 354-55. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05462-w>.
- Woźniczka, Adam, Brygida Wawrzyniak-Wydrowska, Teresa Radziejewska, et Anna Skrzypacz. 2016. « The Quagga Mussel (*Dreissena rostriformis bugensis* Andrusov, 1897) – Another Ponto-Caspian Dreissenid Bivalve in the Southern Baltic Catchment: The First Record from the Szczecin Lagoon ». *Oceanologia* 58 (2): 154-59. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2015.12.002>.
- Wu, Colin Chih-Chien, Amy Peterson, Boris Zinshteyn, Sergi Regot, et Rachel Green. 2020. « Ribosome Collisions Trigger General Stress Responses to Regulate Cell Fate ». *Cell* 182 (2): 404-416.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.006>.
- Wu, Huifeng, Chenglong Ji, Lei Wei, Jianmin Zhao, et Hongjian Lu. 2013. « Proteomic and Metabolomic Responses in Hepatopancreas of *Mytilus galloprovincialis* Challenged by *Micrococcus luteus* and *Vibrio anguillarum* ». *Journal of Proteomics* 94 (décembre): 54-67. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.09.001>.
- Wu, Huifeng, Lanlan Xu, Chenglong Ji, et Deliang Yu. 2016. « Proteomic and Metabolomic Responses in D-Shape Larval Mussels *Mytilus galloprovincialis* Exposed to Cadmium and Arsenic ». *Fish & Shellfish Immunology* 58 (novembre): 514-20. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.064>.
- Xue, Rui, Dinglong Yang, Yijing Han, Qinyou Deng, Xin Wang, Xiangquan Liu, et Jianmin Zhao. 2021. « 14-3-3ζ and 14-3-3ε Are Involved in Innate Immune Responses in Pacific Abalone (*Haliotis discus hannai*) ». *Developmental and Comparative Immunology* 124 (novembre): 104176. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104176>.
- Yaffe, Michael B. 2002. « How Do 14-3-3 Proteins Work? – Gatekeeper Phosphorylation and the Molecular Anvil Hypothesis ». *FEBS Letters*, Protein Domains, 513 (1): 53-57. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03288-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03288-4).
- Yang, Jianqi, Lea Reshef, Hanoch Cassuto, Gabriela Aleman, et Richard W. Hanson. 2009. « Aspects of the Control of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene Transcription ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (40): 27031-35. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.040535>.
- Yasuda, Sayaka, Hikaru Tsuchiya, Ai Kaiho, Qiang Guo, Ken Ikeuchi, Akinori Endo, Naoko Arai, et al. 2020. « Stress- and Ubiquitylation-Dependent Phase Separation of the Proteasome ». *Nature* 578 (7794): 296-300. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1982-9>.
- Youn, Ji-Young, Boris J.A. Dyakov, Jianping Zhang, James D.R. Knight, Robert M. Vernon, Julie D. Forman-Kay, et Anne-Claude Gingras. 2019. « Properties of Stress Granule and P-Body Proteomes ». *Molecular Cell* 76 (2): 286-94. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.014>.
- Yu, Deliang, Chenglong Ji, Jianmin Zhao, et Huifeng Wu. 2016. « Proteomic and Metabolomic Analysis on the Toxicological Effects of As (III) and As (V) in Juvenile Mussel *Mytilus galloprovincialis* ». *Chemosphere* 150 (mai): 194-201. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.113>.
- Zapico, Sara C., et Douglas H. Ubelaker. 2013. « MtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences ». *Aging and Disease* 4 (6): 364-80. <https://doi.org/10.14336/AD.2013.0400364>.
- Zhang, Juankun, Martha Betson, Jennifer Erasmus, Kostas Zeikos, Maryse Bailly, Louise P. Cramer, et Vania M. M. Braga. 2005. « Actin at Cell-Cell Junctions Is Composed of Two Dynamic and

- Functional Populations ». *Journal of Cell Science* 118 (Pt 23): 5549-62. <https://doi.org/10.1242/jcs.02639>.
- Zhang, Stanley (Weihua), et Wenying Jian. 2014. « Recent Advances in Absolute Quantification of Peptides and Proteins Using LC-MS ». *Reviews in Analytical Chemistry* 33 (1): 31-47. <https://doi.org/10.1515/revac-2013-0019>.
- Zheng, Jian-Wei, Su-Li Liu, Song-Hui Lu, Hong-Ye Li, Jie-Sheng Liu, et Wei-Dong Yang. 2018. « Proteomic Profile in the Mussel *Perna viridis* after Short-Term Exposure to the Brown Tide Alga *Aureococcus anophagefferens* ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 162 (octobre): 365-75. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.012>.
- Zhong, Mingyu, Huifeng Wu, Fei Li, Xiujuan Shan, et Chenglong Ji. 2020. « Proteomic Analysis Revealed Gender-Specific Responses of Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) to Trichloropropyl Phosphate (TCPP) Exposure ». *Environmental Pollution* 267 (décembre): 115537. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115537>.

Annexes

Annexe 1 : Characterization of Cu/Zn-SODs in sympatric species: A comparison of zebra and quagga mussels

Béatrice Rocher ^{a,†}, Elise David ^b, Arnaud Tanguy ^c, Aimie Le Saux^a, Lauris Evariste^b, Fanny Louis^b, Laurence Delahaut ^b, Damien Rioult ^{b,e}, Sandrine Pain-Devin ^d, Romain Péden ^{b,d}, Odile Dedourge-Geffard ^b, Simon Devin ^d, Florence Bultelle ^a

^a Université Le Havre Normandie, UMR-I 02 INERIS-SEBIO, Scale FR-CNRS 3730, 76063 Le Havre, France

^b Université de Reims Champagne Ardenne, UMR-I 02 SEBIO, 51097 Reims, France

^c Sorbonne Universités, CNRS UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Equipe DYDIV, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

^d LIEC, Université de Lorraine, CNRS, F-57000 Metz, France

^e Université de Reims Champagne-Ardenne/Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, Plateau Technique mobile de cytométrie environnementale (MOBICYTE), 51097 Reims, France

article info :

Article history:

Received 30 March 2020

Accepted 24 September 2020

Available online 14 October 2020

Communicated by Lee Grapentine

Keywords:

Biomonitoring

Oxidative stress

Sentinel

Invasive species

Dreissena

<https://doi.org/10.1016/j.jglr.2020.09.012> 0380-1330/_ 2020 Published by Elsevier B.V. on behalf of International Association for Great Lakes Research. † Corresponding author.

E-mail address: Beatrice.rocher@univ-lehavre.fr (B. Rocher). *Journal of Great Lakes Research* 46 (2020) 1783–1790 Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Great Lakes Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jglr

Abstract

Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) are commonly used as sentinel organisms in freshwater biomonitoring. The displacement of this species by quagga mussels (*Dreissena rostriformis bugensis*) has raised the issue of their discrimination after field sampling. Even if those two species exhibit specific morphological characteristics, confusion can occur. However, behind the visible phenotypes lie important physiological and metabolic differences that may affect the interpretation of biomarkers in risk assessment. In this study, we present a characterization of Cu/Zn-SODs (superoxide dismutases) in *Dreissena* spp. with a comparison of activity profiles from individuals originating from North America and Europe. A phylogenetic tree was constructed and dreissenid SOD sequences appear to be closely related to clam species sequences. A specific isoform at an isoelectric point value of 4.95 was observed only for quagga mussels independently of their origin, while zebra mussels exhibited several polymorphic profiles, even for a single sampling site. A comparison of transcript sequences was conducted, and the observed differences were highlighted. Alignment of amino acid sequences shows a high level of identity between the two species associated with minor changes in the predicted

Introduction

Bivalves such as *Dreissena polymorpha* are widely used as sentinel organisms in freshwater biomonitoring programs (Hanana et al., 2017; Binelli et al., 2015; Faria et al., 2014; Pain-Devin et al., 2014; Navarro et al., 2011). They have a wide geographical distribution, a filtering and fixed adult lifestyle, significant bioaccumulation capacity, high abundance and are resistant to complex stresses. Originating from the Ponto-Caspian basin, *Dreissena polymorpha* is a well-known invasive species of freshwater rivers in Western Europe and North America (Ginn et al., 2018; Marescaux et al., 2015). A rapid expansion of a related species, *Dreissena rostriformis bugensis*, quagga mussel, has been observed in Western Europe where *D. rostriformis bugensis* may displace *D. polymorpha*, a shift previously observed in North America's Great Lakes (Sturtevant et al., 2019; Kerambrun et al., 2018; Potet et al., 2018; Matthews et al., 2015). In Western Europe, first observations of quagga mussels were made in the Hollands Diep in 2006 (Matthews et al., 2015; Molloy et al., 2007) and in the Meuse River in 2008 (Marescaux et al., 2012; Vaate and Beisel, 2011). In France, *D. rostriformis bugensis* expansion has since been reported in the Rhône drainage and the Oise River (Kerambrun et al., 2018). In this context, efficient discrimination of the two species became crucial. Zebra and quagga mussels indeed present morphological differences, but shell morphotypes can vary and lead to misidentification. Morphological indices based on length, width and height, have been proposed (Teubner et al., 2016; Beggel et al., 2015), but the risk of erroneous classification has already been underlined (Kerambrun et al., 2018; Beggel et al., 2015). For instance, in relation with their habitats, quagga mussels exhibit different shell morphotypes through a developmental plasticity (Peyer et al., 2010). In a biomonitoring context, it appears essential to clearly and correctly identify the species in order to properly analyze ecotoxicological responses (Madeira et al., 2019; Vernon and Jha, 2019; Farkas et al., 2017). Genetic methods based on DNA markers, therefore requiring nucleic acid extractions, have already been developed to differentiate *Dreissena* species (Marescaux and Van Doninck, 2013; Voroshilova et al., 2010). Hence in general, RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism) analysis of the fragment of the mitochondrial gene COI allows the discrimination of the two species (Voroshilova et al., 2010). Superoxide dismutases (SODs) are classic biomarkers in ecotoxicological studies (Manduzio et al., 2004). These enzymes exhibit an oxido-reductase activity that catalyzes dismutation of superoxide anion into molecular oxygen and hydrogen peroxide which is in turn used by the catalase enzyme. Superoxide dismutases therefore represent first line antioxidant defenses. Depending on their metal catalytic cofactors, SODs are classified into distinct groups, (for details see review by Abreu and Cabelli, 2010) and only copper/ zinc SODs and manganese SOD are expressed in animals, the last form being exclusively mitochondrial. Cu/Zn-SODs include extra- and intracellular SODs, each one encoded by a specific gene (Abreu and Cabelli, 2010). The extracellular form contains a signal peptide with a cleavage site for its secretion. The intracellular form, a major SOD, is often referred to as cytosolic Cu/Zn-SOD, although it has been localized not only in the cytosol but in all cellular compartments, including the nucleus and the internal mitochondrial membrane, excluding the mitochondrial matrix (Zelko et al., 2002). SOD activity is often measured on tissue homogenates, but it can also be measured by gel zymography, as developed by Beauchamp and Fridovich (1971), a method that highlights isoforms. Indeed, SODs present distinct properties including electrophoretic mobility and differential susceptibility to inhibitors such as cyanide, allowing a separate study of the different allozymes. Thus, after isoelectrofocusing in native conditions, intracellular Cu/Zn-SOD (SOD1) activity is revealed at pH between 4 and 5 while the other SODs are observed at more basic pH (Manduzio et al., 2003). In the present work, we chose to focus on the intracellular Cu/Zn-SOD and investigate its characteristics in the two *Dreissena* mussels in order to assess whether the sister species could be used interchangeably in environmental surveys. Geographically distant sites were selected for sampling and an in-depth study of intracellular Cu/Zn-SOD was carried out. Enzymatic profiles were analyzed by zymography, and we demonstrated that Cu/Zn-SOD exhibits distinct patterns in the two *Dreissena* species. In order to understand such differences, data mining of published sequences was performed,

allowing us to build a phylogenetic tree that places the sister species side by side with clams as their closest neighbors. Finally, structure prediction for both Cu/Zn SODs was conducted and revealed very similar shapes. Methods analyze ecotoxicological responses (Madeira et al, 2019; Vernon and Jha, 2019; Farkas et al, 2017). Genetic methods based on DNA markers, therefore requiring nucleic acid extractions, have already been developed to differentiate *Dreissena* species (Marescaux and Van Doninck, 2013; Voroshilova et al., 2010). Hence in general, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis of the fragment of the mitochondrial gene COI allows the discrimination of the two species (Voroshilova et al, 2010). Superoxide dismutases (SODs) are classic biomarkers in ecotoxicological studies (Manduzio et al., 2004). These enzymes exhibit an oxido-reductase activity that catalyzes dismutation of superoxide anion into molecular oxygen and hydrogen peroxide which is in turn used by the catalase enzyme. Superoxide dismutases therefore represent first line antioxidant defenses. Depending on their metal catalytic cofactors, SODs are classified into distinct groups, (for details see review by Abreu and Cabelli, 2010) and only copper/zinc SODs and manganese SOD are expressed in animals, the last form being exclusively mitochondrial. Cu/Zn-SODs include extra- and intracellular SODs, each one encoded by a specific gene Abreu and Cabelli, 2010. The extracellular form contains a signal peptide with a cleavage site for its secretion. The intracellular form, a major SOD, is often referred to as cytosolic Cu/Zn-SOD, although it has been localized not only in the cytosol but in all cellular compartments, including the nucleus and the internal mitochondrial membrane, excluding the mitochondrial matrix (Zelko et al., 2002). SOD activity is often measured on tissue homogenates, but it can also be measured by gel zymography, as developed by Beauchamp and Fridovich (1971), a method that highlights isoforms. Indeed, SODs present distinct properties including electrophoretic mobility and differential susceptibility to inhibitors such as cyanide, allowing a separate study of the different allozymes. Thus, after isoelectrofocusing in native conditions, intracellular Cu/Zn-SOD (SOD1) activity is revealed at pH between 4 and 5 while the other SODs are observed at more basic pH (Manduzio et al., 2003). In the present work, we chose to focus on the intracellular Cu/Zn-SOD and investigate its characteristics in the two *Dreissena* mussels in order to assess whether the sister species could be used interchangeably in environmental surveys. Geographically distant sites were selected for sampling and an in-depth study of intracellular Cu/Zn-SOD was carried out. Enzymatic profiles were analyzed by zymography, and we demonstrated that Cu/Zn-SOD exhibits distinct patterns in the two *Dreissena* species. In order to understand such differences, data mining of published sequences was performed, allowing us to build a phylogenetic tree that places the sister species side by side with clams as their closest neighbors. Finally, structure prediction for both Cu/Zn SODs was conducted and revealed very similar shapes.

Methods

All chemicals were of analytical grade and were used as received. Water for preparation of the solutions was purified using a Milli-Q purification system. Nitrobluetetrazolium (NBT), riboflavin, aprotinin and purified Cu/Zn-SOD from bovine erythrocytes and isoelectric focusing markers were purchased from Sigma. Mussels were collected in one location in the St. Lawrence River (Quebec, Canada) and in several locations in the French territory. Sampling maps were previously published in Evariste et al. (2018) for the Canadian part and in Pain-Devin et al. (2014) for the French side. The Canadian site is located upstream of Montreal city at Pointe-des-Cascades (45_19049.90'N; 73_58011.80'W). This site is receiving water masses from the Laurentian Great Lakes and was previously shown to be a low-polluted area (Evariste et al., 2018; Kwan et al., 2003). In Europe, the sampling sites are located in the rivers of north France, namely the Meuse (E5_32004; N48_53014), Moselle (E6_04043; N49_03058), Vilaine (W2_18030; N47_31022) and Oise (E2_30036; N49_16050). These sites have already been the subject of environmental monitoring under the research program IPOC (Interactions between pollution and climate changes: development of an improved monitoring strategy, ANR-12-ISV7-0004-01, 2013–2015), and the presence of *Dreissena* is confirmed, either as monospecific assemblages or as sympatric populations of both species (Kerambrun et al., 2018, 2016). Hemolymph was withdrawn from the posterior adductor muscle sinus using a 0.5 mL syringe with a

0.33 mm – 12 mm needle and stored at –80 °C. Mantles were preserved in 70% ethanol. After dissection, gills and digestive glands were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until further analysis. Genetic species identification was carried by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis performed on the mitochondrial COI gene using RSA I enzyme according to a method adapted from Voroshilova et al. (2010). For details, total genomic DNA was extracted from mussel mantle using phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1). The fragment of COI mitochondrial DNA containing the RSA I restriction site was amplified using COI universal primers (50-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-30 and 50-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-30) from Black et al. (1994). PCR amplifications were performed in a volume of 25 µL containing 1 µL Taq polymerase buffer, 2 mM MgCl₂, 80 µM deoxynucleotides (dNTPs), 10 pmol of each primer, 0.5 units of TAQ Pol DNA polymerase (Euromedex, France) and about 10 ng of total genomic DNA. The following steps were applied for the PCR: denaturation at 94 °C for 4 min, then 35 cycles at 94 °C for 50 s, 56 °C for 50 s, 72 °C for 1 min, and a final step at 72 °C for 10 min. Resulting fragments were hydrolyzed using RsaI restriction endonuclease (Euromedex, France), following the manufacturer's instructions. Restriction fragments were visualized under UV light after electrophoresis on a 2% agarose gel in Tris Borate EDTA 0.5% buffer, and staining with ethidium bromide. Gills and digestive glands were homogenized by Precellys grinding in an ice-cold solution of 100 mM Tris, 60 mM saccharose, 60 mM mannitol, 3 mM EDTA, 1.5 mM aprotinin, pH 7.5. The homogenates were centrifuged at 10,000g, at 4 °C for 15 min. After centrifugation, supernatants containing the cytosolic fraction were collected. If analyses were done the same day, samples were kept at 4 °C otherwise they were stored at –80 °C. Protein concentration of each extract was measured with bovine serum albumin as a standard according to the Bradford method (Bradford, 1976). Isoelectric focusing (IEF) was carried out in a Multiphor II equipment (Amersham Pharmacia Biotech, France) on gels with pH range 4.0–5.0 for a better resolution of Cu/Zn-SOD isoforms. The isoelectric point values (pI) were determined in regard with an isoelectric focusing calibration kit. Electrophoreses were performed at 60 mA at 4 °C for 2 h. Current was applied on electrode strips soaked either into an anode solution (1 M H₃PO₄) or into a cathode solution (1 M glycine). Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed with a 10% polyacrylamide running gel at 150 mV at 4 °C for 2 h. In both electrophoreses, purified bovine Cu/Zn-SOD was loaded as control. Revelation of SOD activity was performed on gel immediately after the achievement of electrophoresis using the nitrobluetetrazolium (NBT) photochemical method of Beauchamp and Fridovich (1971). The gels were soaked for 30 min in 2.5 mM NBT, in darkness, under gentle agitation and then incubated in a solution of 1 M phosphate buffer (pH 7.8) containing 0.05 mM riboflavin and 0.4% TEMED (v/v) for 30 min, once again in the dark and under constant agitation. Finally, the gels were exposed to light for 15 min in a 10 mM phosphate buffer (pH 7.8). Achromatic bands in the gels indicated SOD activity. The gels were using GS-800 densitometer, BIO-RAD and subsequently analyzed by Image Lab (version 4.1, BIO-RAD) software.

Transcripts encoding Cu/Zn-SOD sequences were searched in annotated transcriptome databases. For details, databases were constructed using either gills or digestive glands of quagga and zebra mussels found in the French rivers. Following translation using the SIB Bioinformatics Resource Portal (tool, Translate, <https://web.expasy.org/translate/>), the protein's local structural features were predicted from the primary sequence using NetSurfP-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi>, Klausen et al. 2019). For both species Cu/Zn SOD sequences, variant annotations such as Single Nuclear Polymorphisms (SNPs) and INsertion/ Fig. 1. Characterization of Cu/Zn-SOD profiles by zymography. A- Representative zymogram demonstrating distinct specific profiles of Cu/Zn-SOD activity between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis*. Achromatic bands were obtained after isoelectrofocusing and revelation of SOD activity by the nitrobluetetrazolium photochemical method of Beauchamp and Fridovich, 1971. B- Profiles of Cu/Zn-SOD activity in *Dreissena* samples collected from different tissues. Zymograms show an identical pattern in gills and digestive gland for one individual. L1 to L6, animals correspond to zebra mussels, except L4, a quagga mussel. Cu/Zn-SOD isoforms were separated according to their pI using non-denaturing IEF. C- Species identification by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis. RFLP profiles of RsaI digested PCR products of cytochrome c oxidase subunit I gene amplified from *Dreissena polymorpha* and from *Dreissena*

rostriformis bugensis. Fig. 2. Distribution of Cu/Zn-SOD profiles in *Dreissena* samples collected from different areas. Animals were sampled in France (4 rivers) and in Canada (Saint-Laurent River). Cu/Zn-SOD isoforms were separated according to their pI using non-denaturing IEF. Three patterns were obtained after NBT staining. For details, in the Moselle River a unique band corresponding to quagga mussels is observed. In the Vilaine and Meuse, two distinct patterns of Cu/Zn-SOD activity were observed corresponding only to zebra mussels. In the sites where the two species of *Dreissena* coexist (Oise and Saint-Laurent Rivers) the three patterns of SOD activity are found, similar to those obtained for the two species in the other sampled sites. DEletions events (INDELs) were issued from previously published transcriptomes (Péden et al., 2019). As mentioned in the study, variant callings were realized with Genome Analysis Toolkit (GATK) following the best practices found on the GATK website (McKenna et al., 2010). Phylogenetic trees were generated with the maximum composite likelihood (ML) algorithm in Mega v6 software (Tamura et al., 2013). The Akaike Information Criterion was used to determine the best evolution model and JTT was retained for the nodes was estimated used by a bootstrap with 1000 pseudoreplicates (Felsenstein, 1985). Genetic sequences of SOD proteins of other species used in these phylogenetic analyses were obtained from the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Results and discussion

Characterization of Cu/Zn SODs Zymograms of Cu/Zn-SOD activity show specific contrasted patterns that clearly discriminate quagga and zebra individuals (Fig. 1A).

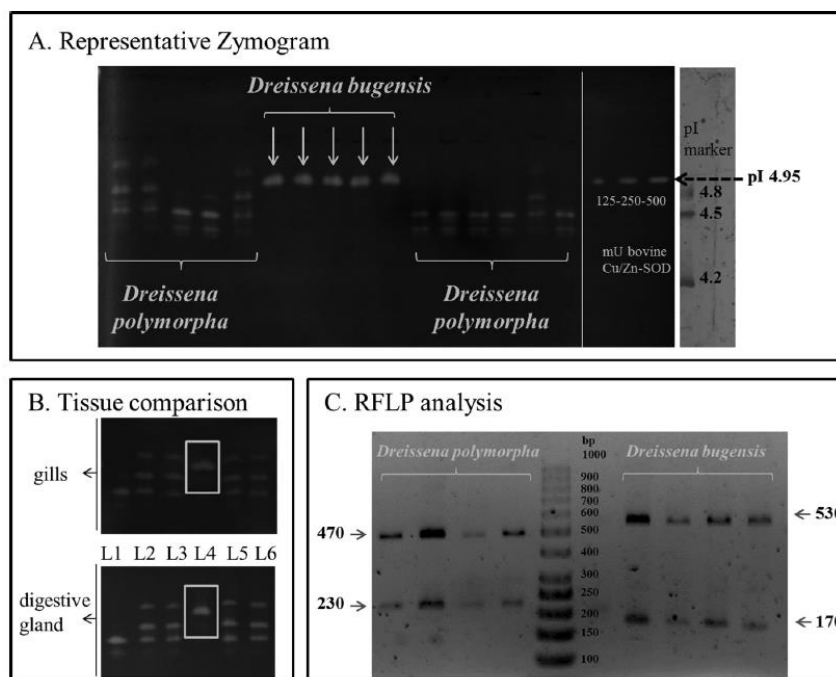


Fig. 1. Characterization of Cu/Zn-SOD profiles by zymography. A- Representative zymogram demonstrating distinct specific profiles of Cu/Zn-SOD activity between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis*. Achromatic bands were obtained after isoelectrofocusing and revelation of SOD activity by the nitrobluetetrazolium photochemical method of Beauchamp and Fridovich, 1971. B- Profiles of Cu/Zn-SOD activity in *Dreissena* samples collected from different tissues. Zymograms show an identical pattern in gills and digestive gland for one individual. L1 to L6, animals correspond to zebra mussels, except L4, a quagga mussel. Cu/Zn-SOD isoforms were separated according to their pI using non-denaturing IEF. C- Species identification by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis. RFLP profiles of Rsal digested PCR products of cytochrome c oxidase subunit I gene amplified from *Dreissena polymorpha* and from *Dreissena rostriformis bugensis*.

Indeed, the quagga mussel is characterized by a major band at pI 4.95. The purified bovine erythrocyte Cu/Zn-SOD loaded as a control exhibited the same pI. By contrast, the zebra mussel shows multiband

profiles at more acidic isoelectric points. In detail, two characteristic patterns were obtained, one with a major band at pI 4.6, the other with 3 major bands at pI 5.0, 4.8 and 4.6, suggesting higher genetic variability in the zebra than in the quagga mussel population (Fig. 1B). Individual's sampled in France Fig. 3. Zymogram of Cu/Zn-SOD allozymes after PAGE and NBT revelation from *Dreissena rostriformis bugensis* and from *Dreissena polymorpha*. Homogenates are separated in a 10% PAGE. Images of NBT staining are presented in inversed grey colors for a better visualization of the bands. Arrows indicated Cu/Zn-Sod activity. Fig. 4. Phylogenetic analysis of Cu/Zn-SODs. Phylogenetic trees were generated with the maximum composite likelihood algorithm in Mega v6 software (Tamura et al., 2013). Statistical support for the nodes was estimated used by a bootstrap with 1000 pseudoreplicates (Felsenstein, 1985). Species identity was confirmed morphologically and genetically (Fig. 1C).

Comparison of Cu/Zn SOD profiles of geographically distant mussels Zymogram profiles of animals collected in France were compared to those of mussels from Canada (Fig. 2).

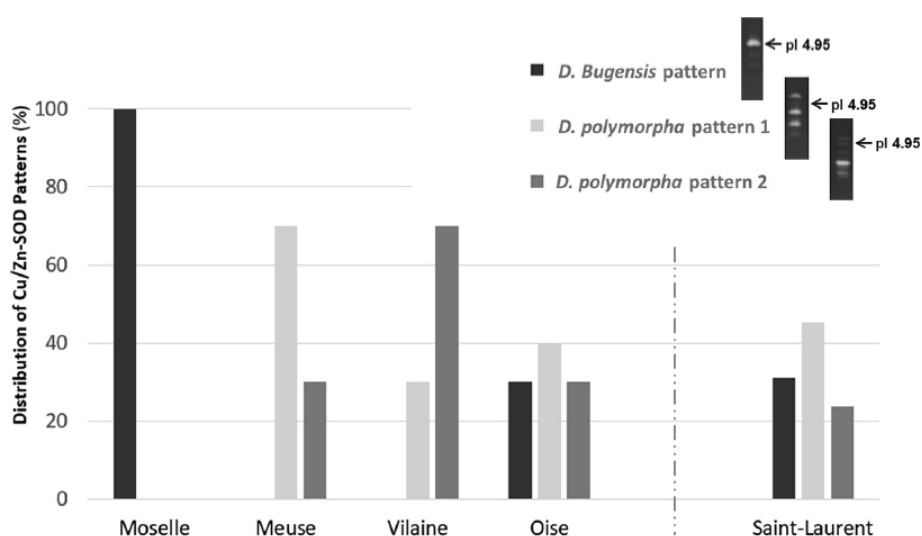


Fig. 2. Distribution of Cu/Zn-SOD profiles in *Dreissena* samples collected from different areas. Animals were sampled in France (4 rivers) and in Canada (Saint-Laurent River). Cu/Zn-SOD isoforms were separated according to their pI using non-denaturing IEF. Three patterns were obtained after NBT staining. For details, in the Moselle River a unique band corresponding to quagga mussels is observed. In the Vilaine and Meuse, two distinct patterns of Cu/Zn-SOD activity were observed corresponding only to zebra mussels. In the sites where the two species of *Dreissena* coexist (Oise and Saint-Laurent Rivers) the three patterns of SOD activity are found, similar to those obtained for the two species in the other sampled sites.

All quagga mussels, at any site, exhibit the same characteristic profile with a main Cu/Zn-SOD band at pI 4.95. For the zebra mussels, the two main profiles described above were found. Thus, it appears that differences in electrophoretic mobility of Cu/Zn-SOD isoforms are clearly species-related since they are conserved in geographically remote areas.

Cu/Zn-SOD profiles as a tool for species discrimination Because zymographic profiles are different between the two species, the question of using this characteristic to recognize the different species has arisen. Hemolymph constitutes a good candidate for this application because this tissue is minimally invasive and relatively easy to collect. The tests showed that 20 mL of hemolymph was sufficient to visualize SOD and discriminate between Fig. 5. Amino acid sequence alignment of Cu/Zn-SODs. In line 1, Drpol, the primary sequence of *Dreissena polymorpha*; in line 2, Drbug, the primary sequence of *Dreissena rostriformis bugensis*. Amino acid differences were shaded; the residues required for copper (His-47, -49, -64 and -120) and zinc (His-64, -72, -81 and Asp-84) fixation are in bold. The two cysteines predicted to form a disulfide bond were underlined. Fig. 6. Secondary structure representation of Cu/Zn-SODs. Models of protein's local structural features were predicted from the

primary sequences of *Dreissena polymorpha* (up) and *Dreissena rostriformis bugensis* (down) using NetSurfP-2.0. Three secondary sequence differences (black rectangles) were observed between both species, with Q → E in position 75 creating a small α -helix in *polymorpha*, C → S in position 101 leading to a smaller β -sheet in *quagga*, and a smaller α -helix in *quagga* between positions 130 and 135 with no sequence difference. Species after IEF (data not shown). We also checked that samples prepared for other enzymatic tests with 10 mM Tris buffer pH7 or 100 mM phosphate buffer pH7.5 allow the construction of zymographic profiles. Hence samples stored at minus 20 °C could be used later for species identification by SOD zymogram analyses. Such a result is consistent with the very high stability of this enzyme. Finally an element that can limit the use of such a test is the availability of hardware allowing the IEF. Therefore, SOD profiles were tested on classic non denaturing gel electrophoresis PAGE.

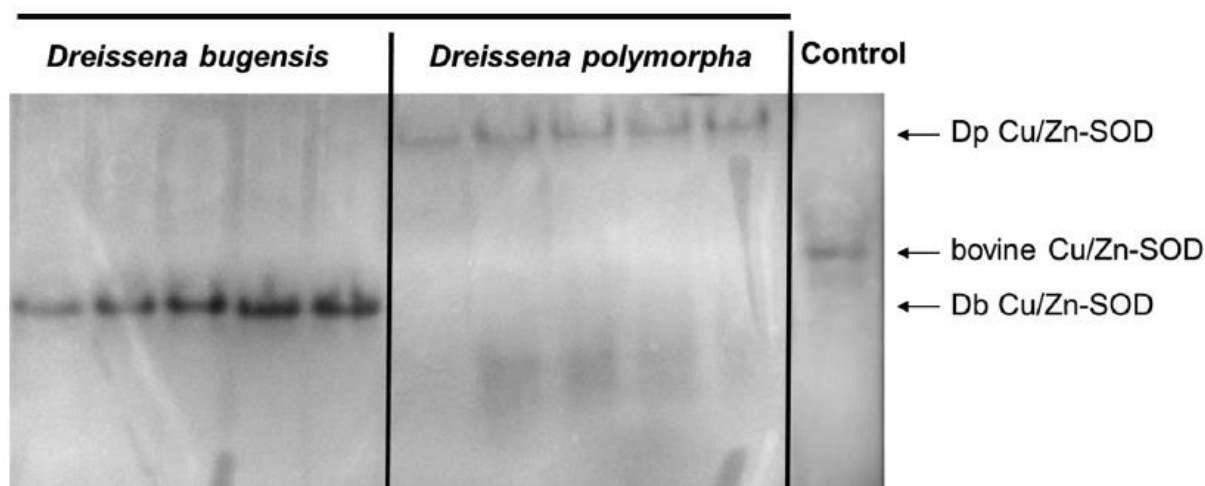


Fig. 3. Zymogram of Cu/Zn-SOD allozymes after PAGE and NBT revelation from *Dreissena rostriformis bugensis* and from *Dreissena polymorpha*. Homogenates are separated in a 10% PAGE. Images of NBT staining are presented in inversed grey colors for a better visualization of the bands. Arrows indicated Cu/Zn-Sod activity.

As shown in Fig. 3, zebra and quagga mussels are clearly discriminated with a separate main band for each species. Phylogenetic analysis of Cu/Zn-SODs A phylogenetic tree was constructed based on the intracellular Cu/Zn-SOD amino acid sequence from the two dresenid species and other invertebrates and vertebrates (Fig. 4).

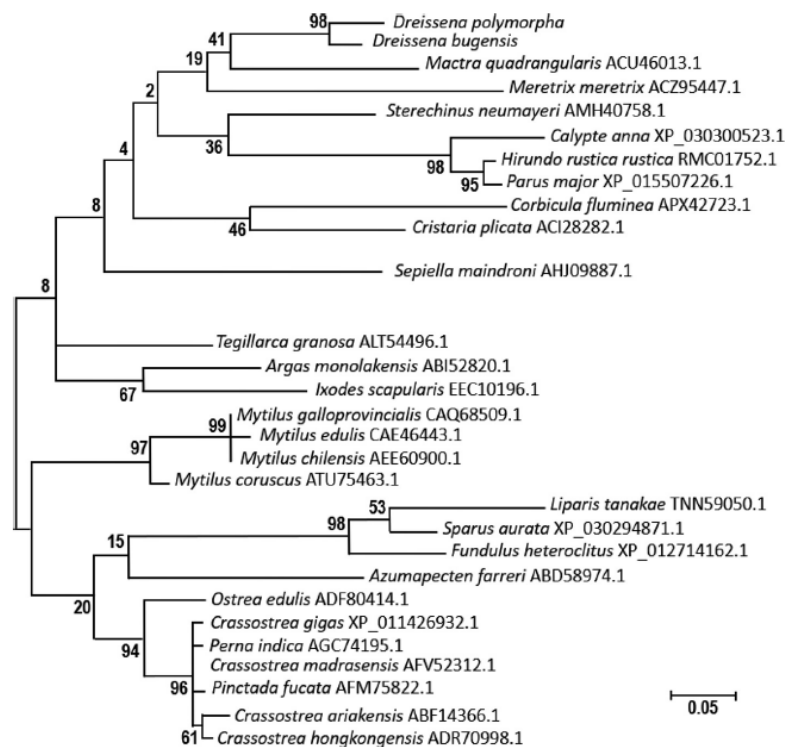


Fig. 4. Phylogenetic analysis of Cu/Zn-SODs. Phylogenetic trees were generated with the maximum composite likelihood algorithm in Mega v6 software (Tamura et al., 2013). Statistical support for the nodes was estimated used by a bootstrap with 1000 pseudoreplicates (Felsenstein, 1985).

The tree shaped two main clades (even branch nodes show a low bootstrap value). Interestingly, the dresenid SODs are not clustered in the marine mussels and oyster group but are closely related to sequences of SOD from clam species (*Mactra quadrangularis* and *Meretrix meretrix*). Moreover, the percentage of identities between all those SOD sequences are close to 70% showing a high level of conservation as it has already been described in other studies relating to the sequencing of SOD in *Dreissena* sp. or in other bivalves (Wu et al, 2017; Anju et al, 2013; Gao et al, 2012; Ni et al., 2007; Geret et al, 2004).

Comparison of secondary structures

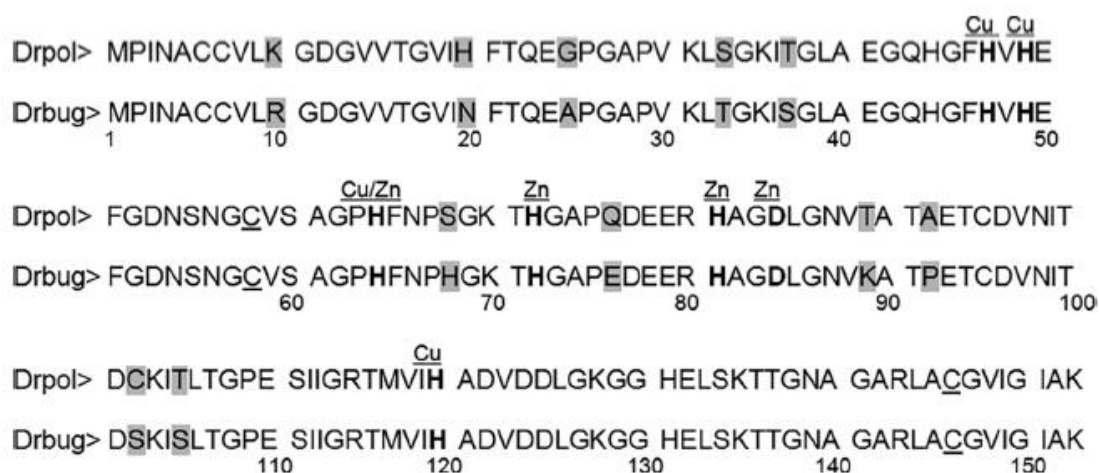


Fig. 5. Amino acid sequence alignment of Cu/Zn-SODs. In line 1, Drpol, the primary sequence of *Dreissena polymorpha*; in line 2, Drbug, the primary sequence of *Dreissena rostriformis bugensis*. Amino acid differences were shaded; the residues required for copper (His-47, -49, -64 and -120) and zinc (His-64, -72, -81 and Asp-84) fixation are in bold. The two cysteines predicted to form a disulfide bond were underlined.

Alignment of amino acid sequences were performed with the two cytosolic Cu/Zn-SOD sequences from *D. polymorpha* and *D. bugensis*. The sequences exhibited two conserved cysteine residues (Cys-58 and 146) needed for disulfide bond formation and highly conserved residues involved in copper and zinc fixation (Fig. 5). Amino acid comparison shows only 11 variations among the total of 153 amino acids signifying 93% of identity between the 2 sequences. Of the 11 variations, 5 amino acids share similar properties. For instance, the switch from glutamine to glutamic acid and that of cysteine to serine don't lead to major property changes. In such a way, it raised to 96% the similarity between the cytosolic Cu/Zn-SODs of the two species. At this point, both proteins were identical at a very high level, with only single amino acid modification points. However, these differences lead to minor changes in secondary sequence with the appearance of an α -helix (position 75), a longer b-sheet (position 101) and a longer α -helix between position 130 and 135 in *Dreissena polymorpha* comparing *Dreissena rostriformis bugensis* (Fig. 6).

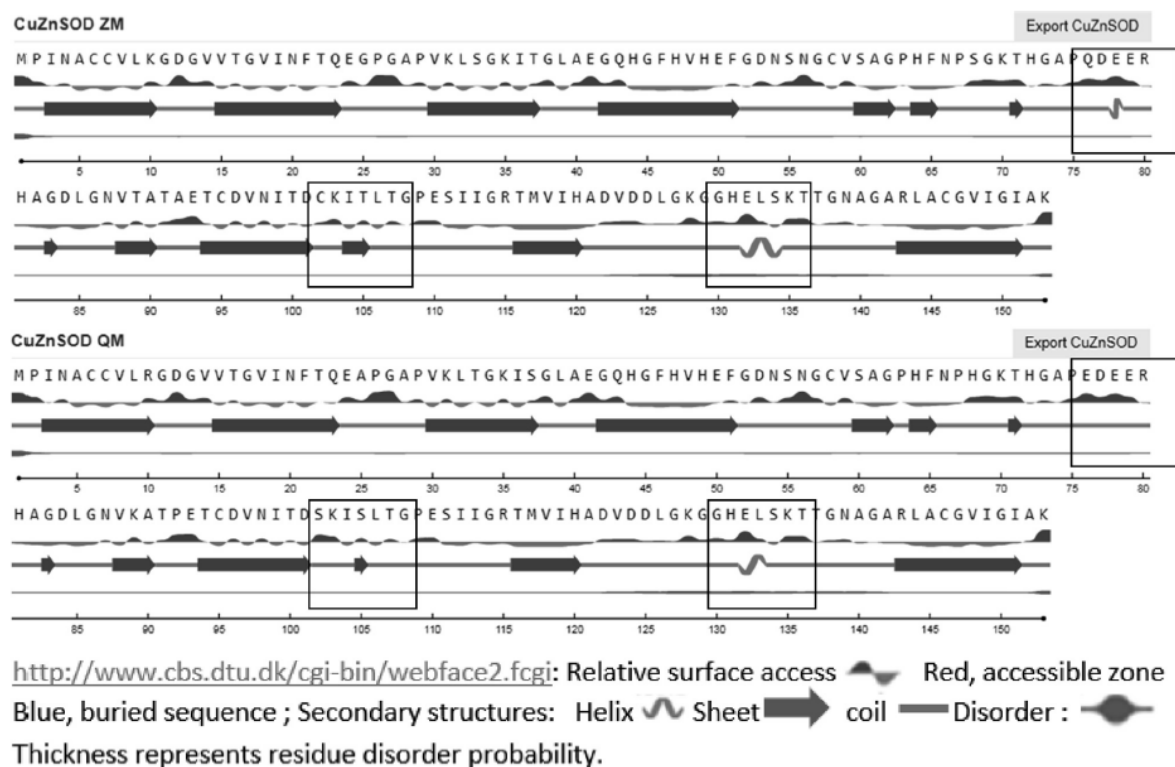


Fig. 6. Secondary structure representation of Cu/Zn-SODs. Models of protein's local structural features were predicted from the primary sequences of *Dreissena polymorpha* (up) and *Dreissena rostriformis bugensis* (down) using NetSurfP-2.0. Three secondary sequence differences (black rectangles) were observed between both species, with Q → E in position 75 creating a small α -helix in *polymorpha*, C → S in position 101 leading to a smaller b-sheet in quagga, and a smaller α -helix in quagga between positions 130 and 135 with no sequence difference.

Additionally, 40 SNPs and INDELs events were found on both Cu/Zn-SOD transcript sequences (data not shown) with Fig. 7. SNP positions in Cu/Zn-SOD nucleotide sequence for *Dreissena polymorpha* (Dp SODC) and *Dreissena rostriformis bugensis* (Db SODC). SNPs are highlighted by shaded residues. In the squares, SNPs that changes the amino acid sequence without changes at the secondary structure level. The double square corresponds to the only SNP that impacts the secondary sequence of the protein. respectively 10 and 14 events within *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* coding sequences (Fig. 7).

```

>Dp_SODC
atg cca att aac gca tgc tgt gtt ctt aaa ggc gat ggt gtc gtt acg ggt gtt att/a a/cat
M P I N A C C V L K G D G V V T G V I/I N/H
ttt aca caa gag ggt cca ggt gc/aa cca/t gta aaa ttg agt ggc aaa att aca ggc tta gca
F T Q E G P G A/E P/P V K L S G K I T G L A
gag gga cag cat ggc ttc cat gtg cat gag ttt gga gac aac agc aat ggg tgt gta agt
E G Q H G F H V H E F G D N S N G C V S
gct gga ccc cac ttc aat cca agt g/tgc aaa act cac ggg gct cct cag/t gat gag gaa a/cga
A G P H F N P S G/C K T H G A P Q/H D E E R/R
cat gcc gga gat ctg gga aac gtg aca gca acg gca gag acg tgc/t gat gtg aac atc aca
H A G D L G N V T A T A E T C/C D V N I T
gac tgc aag att act ctg act ggc cca gaa tct atc att ggc cgt acc atg gtg att cat
D C K I T L T G P E S I I G R T M V I H
gct gat gta gac/t gac ctt ggg aag gga ggt cat gaa ctc tcc aag acg aca ggc aat gct
A D V D/D D L G K G G H E L S K T T G N A
gga gct cgt ctg gca tgt gga gta att ggc atc/t gcc aag tag
G A R L A C G V I G I/I A K -

>Db_SODC
atg cca att/a aac gca tgc tgt gtg ctt ag/aa ggc gat ggt gtc gtt acg ggt gtt att aat
M P I/I N A C C V L R/K G D G V V T G V I N
tt/g t aca caa gag gct cca ggt gca c/tca gta/c aag ttg act ggc aaa att agt ggc tta gca
F/C T Q E A P G A P/S V/V K L T G K I S G L A
gag gga cag cat ggc ttc cat gta cat gag ttt gga gac aac agc aat gga tgc gta agc
E G Q H G F H V H E F G D N S N G C V S
gct ggg ccc cac ttc aat cca/g c/aac ggc aaa acc cat ggc gct cct gaa gat gag gaa aga
A G P H F N P/P H/N G K T H G A P E D E E R
cat gcc gga gat ttg gga aat gtg/c aag gcg acc cca gag acg tgt gac gtg aac atc aca/t
H A G D L G N V/V K A T P E T C D V N I T/T
gac agc aag atc tcc ctc act ggc cca gaa tct atc att ggc cgt/a acc atg gtg att cat
D S K I S L T G P E S I I G R/R T M V I H
gct gac gta gac/t gac ctt ggg aag gga ggt cat gaa ctc tcc aag aca acc ggc aat gc/t,g
A D V D/D D L G K G G H E L S K T T G N A/A,A
gga gct cgt ctg/t gca tgt gga gtc atc ggc atc/t gcc aag tag
G A R L/L A C G V I G I/I A K -

```

fig. 7. SNP positions in Cu/Zn-SOD nucleotide sequence for *Dreissena polymorpha* (Dp SODC) and *Dreissena rostriformis bugensis* (Db SODC). SNPs are highlighted by shaded residues. In the squares, SNPs that changes the amino acid sequence without changes at the secondary structure level. The double square corresponds to the only SNP that impacts the secondary sequence of the protein.

Fig. 7. SNP positions in Cu/Zn-SOD nucleotide sequence for *Dreissena polymorpha* (Dp SODC) and *Dreissena rostriformis bugensis* (Db SODC). SNPs are highlighted by shaded residues. In the squares, SNPs that changes the amino acid sequence without changes at the secondary structure level. The double square corresponds to the only SNP that impacts the secondary sequence of the protein.

Among these events, 6 were silent for *Dreissena polymorpha* and 10 for *Dreissena rostriformis bugensis*. Remarkably, only one SNP impacts the secondary protein's sequence, and it is present in the *Dreissena polymorpha* sequence. Moreover, these slight differences could be accompanied by changes in the quaternary structure and may explain the differences in isoelectric point observed between the two species.

Conclusions

The characterization of Cu/Zn-SODs has allowed us to identify significant differences between the isoforms of zebra and quagga mussels and propose their use as species enzymatic markers. At the nucleotide sequence level, the transcripts are also different, which allows the use of specific primer sets to measure Cu/Zn- SOD gene expression in these two species (Kerambrun et al.,2018). Hence cytosolic Cu/Zn-SOD can be used as a discrimination marker for quagga and zebra mussels at the functional, structural and transcriptomic levels. Moreover, SOD is a stable enough enzyme to permit *Dreissena* species verification based on a posteriori analyses of homogenates prepared for other enzymatic assays. The study of Cu/Zn-SOD in *Dreissena* sp. revealed the existence of isoforms specific to zebra and quagga mussels and, incidentally, provided a tool for species discrimination using a simple enzymatic test. Finally, as superoxide dismutases are among the first defenses against ROS damages, differences in Cu/Zn-SOD isoforms in the two dreissenid species could contribute to a possible

contrasting response in sensitivity to oxidative stress and metal pollutants as already observed (Louis et al., 2019). Further studies should shed light on this issue.

Data availability

Data are available on request to the corresponding author (beatrice.rocher@univ-lehavre.fr).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Aimie Le Saux was a recipient of a PhD grant from the French Ministry for Research. The study was partly financially supported by both ANR and NSERC Agencies (joined France-Canada project) as a part of the research program IPOC (Interactions between POLLution and Climate changes: Development of improved monitoring strategy, ANR-12-ISV7-0004-01, CRSNG-STPGP-430539-2012, 2013-2016, <https://www-ium.univ-brest.fr/ipoc/fr>) as well as the FR CNRS 3730 SCALE. We thank Mélissa Palos-Ladeiro, Elodie Kerambrun and Estelle Petiau for their help.

References

- Abreu, I.A., Cabelli, D.E., 2010. Superoxide dismutases - a review of the metalassociated mechanistic variations. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* 1804, 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.005>.
- Anju, A., Jeswin, J., Thomas, P.C., Paulton, M.P., Vijayan, K.K., 2013. Molecular cloning, characterization and expression analysis of cytoplasmic Cu/Znsuperoxide dismutase (SOD) from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 946–950. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.12.024>.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8).
- Beggel, S., Cerwenka, A., Brandner, J., Geist, J., 2015. Shell morphological versus genetic identification of quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquat. Invasions* 10, 93–99. <https://doi.org/10.3391/ai.2015.10.1.09>.
- Binelli, A., Della Torre, C., Magni, S., Parolini, M., 2015. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environ. Pollut.* 196, 386–403. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.023>.
- Black, M., Folmer, O., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3, 294–299.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 258–254.
- Evariste, L., David, E., Cloutier, P.-L., Brousseau, P., Auffret, M., Desrosiers, M., Groleau, P.E., Fournier, M., Betoulle, S., 2018. Field biomonitoring using the zebra mussel *Dreissena polymorpha* and the quagga mussel *Dreissena bugensis* following immunotoxic reponses. Is there a need to separate the two species? *Environ. Pollut.* 238, 706–716. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.20187.03.098>.
- Faria, M., Ochoa, V., Blázquez, M., Juan, M.F.S., Lazzara, R., Lacorte, S., Soares, A.M.V. M., Barata, C., 2014. Separating natural from anthropogenic causes of

impairment in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) populations living across a pollution gradient. *Aquat. Toxicol.* 152, 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.020>.

Farkas, A., Ács, A., Vehovszky, Á., Falfusynska, H., Stoliar, O., Specziár, A., Györi, J., 2017. Interspecies comparison of selected pollution biomarkers in dreissenid spp. inhabiting pristine and moderately polluted sites. *Sci. Total Environ.* 599–600, 760–770. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.033>.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.

Gao, X., He, C., Liu, H., Li, H., Zhu, D., Cai, S., Xia, Y., Wang, Y., Yu, Z., 2012. Intracellular Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) from hard clam *Meretrix meretrix*: its cDNA cloning, mRNA expression and enzyme activity. *Mol. Biol. Rep.* 39, 10713–10722. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1962-8>.

Geret, F., Manduzio, H., Company, R., Leboulenger, F., Bebianno, M.J., Danger, J.M., 2004. Molecular cloning of superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) from aquatic molluscs. *Marine Environ. Res.* 58, 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.052>.

Ginn, B.K., Bolton, R., Coulombe, D., Fleischaker, T., Yerec, G., 2018. Quantifying a shift in benthic dominance from zebra (*Dreissena polymorpha*) to quagga (*Dreissena rostriformis bugensis*) mussels in a large, inland lake. *J. Great Lakes Res.* 44, 271–282. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2017.12.003>.

Hanana, H., Turcotte, P., André, C., Gagnon, C., Gagné, F., 2017. Comparative study of the effects of gadolinium chloride and gadolinium – based magnetic resonance imaging contrast agent on freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere* 181, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.073>.

Kerambrun, E., Rioult, D., Delahaut, L., Evariste, L., Pain-Devin, S., Auffret, M., Geffard, A., David, E., 2016. Variations in gene expression levels in four European zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, populations in relation to metal bioaccumulation: A field study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 134, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.051>.

Kerambrun, E., Delahaut, L., Geffard, A., David, E., 2018. Differentiation of sympatric zebra and quagga mussels in ecotoxicological studies: a comparison of morphometric data, gene expression, and body metal concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 154, 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.018>.

Klausen, M.S., Jespersen, M.C., Nielsen, H., Jensen, K.K., Jurtz, V.I., Sønnerby, C.K., Sommer, M.O.A., Winther, O., Nielsen, M., Petersen, B., et al., 2019. NetSurfP-2.0: Improved prediction of protein structural features by integrated deep learning. *Proteins* 87, 520–527. <https://doi.org/10.1002/prot.25674>.

Kwan, K.H.M., Chan, H.M., De Lafontaine, Y., 2003. Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) along the St. Lawrence River. *Environ. Monitor. Assess.* 88, 193–219. <https://doi.org/10.1023/A:1025517007605>.

Louis, F., Devin, S., Giambérini, L., Potet, M., David, E., Pain-Devin, S., 2019. Energy allocation in two dreissenid species under metal stress. *Environ. Pollut.* 245, 889–897. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.079>.

Madeira, D., Mendonça, V., Madeira, C., Gaiteiro, C., Vinagre, C., Diniz, M.S., 2019. Molecular assessment of wild populations in the marine realm: importance of taxonomic, seasonal and habitat patterns in environmental monitoring. *Sci. Total Environ.* 654, 250–263. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.064>.

Manduzio, H., Monsinjon, T., Rocher, B., Leboulenger, F., Galap, C., 2003.

Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 64, 73–83. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00026-2](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00026-2).

Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue Mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Znsuperoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.* 70, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.07.003>.

Marescaux, J., Molloy, D.P., Giamberini, L., Albrecht, C., Van Doninck, K., 2012. First recors of the quagga mussels, *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897), in the Meuse River within France. *BiolInvasions Rec.* 1, 273–276. <https://doi.org/10.3391/bir.2012.1.4.05>.

Béatrice Rocher, E. David, A. Tanguy et al. *Journal of Great Lakes Research* 46 (2020) 1783–1790 1789

Marescaux, J., Van Doninck, K., 2013. Using DNA barcoding to differentiate invasive *Dreissena* species (Mollusca, Bivalvia). *ZooKeys* 365, 235–244. <https://doi.org/10.3897/zookeys.365.5905>.

Marescaux, J., Boets, P., Lorquet, J., Sablon, R., Van Doninck, K., Beisel, J.-N., 2015. Sympatric *Dreissena* species in the Meuse River: towards a dominance shift from zebra to quagga mussels. *Aquat. Invasions* 10, 287–298. <https://doi.org/10.3391/ai.2015.10.3.04>.

Matthews, J., Schipper, A.M., Hendriks, A.J., Yen Le, T.T., bij de Vaate, A., Van der Velde, G., Leuven, R.S.E.W., 2015. A dominance shift from the zebra mussel to the invasive quagga mussel may alter the trophic transfer of metals. *Environ. Pollut.* 203, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.032>.

McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytzsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., et al., 2010. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20, 1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>.

Molloy, D.P., bij de Vaate, A., Wilke, T., Giamberini, L., 2007. Discovery of *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov 1897) in Western Europe. *Biol. Invasions* 9, 871–874.

Navarro, A., Faria, M., Barata, C., Piña, B., 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ. Pollut.* 159, 100–107. <https://doi.org/10.1007/s10530-006-9078-5>.

Ni, D., Song, L., Gao, Q., Wu, L., Yu, Y., Zhao, J., Qiu, L., Zhang, H., Shi, F., 2007. The cDNA cloning and mRNA expression of cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase (SOD) gene in scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 1032–1042. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.04.008>.

Pain-Devin, S., Cossu-Leguille, C., Geffard, A., Giambérini, L., Jouenne, T., Minguez, L., Naudin, B., Parant, M., Rodius, F., Rousselle, P., et al., 2014. Towards a better understanding of biomarker response in field survey: a case study in eight populations of zebra mussels. *Aquat. Toxicol.* 155, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.008>.

Péden, R., Poupin, P., Sohm, B., Flayac, J., Giambérini, L., Klopp, C., Louis, F., Pain-Devin, S., Potet, M., Serre, R.-F., et al., 2019. Environmental transcriptomes of invasive *Dreissena*, a model species in ecotoxicology and invasion biology. *Sci. Data* 6, 234. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0252-x>.

Peyer, S., Hermanson, J.C., Lee, C.E., 2010. Developmental plasticity of shell morphology of quagga mussels from shallow anddeep-water habitats of the Great Lakes. *J. Exp. Biol.* 213, 2602–2609. <https://doi.org/10.1242/jeb.042549>.

Potet, M., Giambérini, L., Pain-Devin, S., Louis, F., Bertrand, C., Devin, S., 2018.

- Differential tolerance to nickel between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* populations. Sci. Rep. 8, 700. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0252-x>.
- Sturtevant, R.A., Mason, D.M., Rutherford, E.S., Elgin, A., Lower, E., Martinez, F., 2019. Recent history of nonindigenous species in the Laurentian Great Lakes; an update to Mills et al., 1993 (25 years later). J. Great Lakes Res. 45, 1011–1035. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2019.09.002>.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Teubner, D., Wesslein, A.-K., Rønne, P.B., Veith, M., Frings, C., Paulus, M., 2016. Is a visuo-haptic differentiation of zebra mussel and quagga mussel based on a single external morphometric shell character possible? Aquat. Invasions 11, 145–154. <https://doi.org/10.3391/ai.2016.11.2.04>.
- Vaate, A., Beisel, J.-N., 2011. Range expansion of the quagga mussel *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) in Western Europe: first observation from France. Aquat. Invasions 6, S71–S74. <https://doi.org/10.3391/ai.2011.6.S1.016>.
- Vernon, E.L., Jha, A.N., 2019. Assessing relative sensitivity of marine and freshwater bivalves following exposure to copper: application of classical and novel genotoxicological biomarkers. Mutation Res./Genetic Toxicol. Environ. Mutagenesis 842, 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.01.008>.
- Voroshilova, I.S., Artamonova, V.S., Makhrov, A.A., Slyn'ko, Yu.V., 2010. Natural hybridization of two mussel species *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) and *Dreissena bugensis* (Andrusov, 1897). Biol. Bull. Russ. Acad. Sci. 37, 542–547. <https://doi.org/10.1134/S1062359010050158>.
- Wu, J., Bao, M., Ge, D., Huo, L., Lv, Z., Chi, C., Liao, Z., Liu, H., 2017. The expression of superoxide dismutase in *Mytilus coruscus* under various stressors. Fish Shellfish Immunol. 70, 361–371. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.08.018>.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J., 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radical Biol. Med. 33, 337–349. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00905-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00905-X).
- Béatrice Rocher, E. David, A. Tanguy et al. Journal of Great Lakes Research 46 (2020) 1783–1790 1790

Annexe 2 : New Insights into cellular Impacts of metals in aquatic animals

Aimie Le Saux¹, Elise David², Stéphane Betoulle², Florence Bultelle¹, Béatrice Rocher¹, Iris Barjhoux² and Claudia Cosio^{2,1}

Normandie Univ , UNIHAVRE, UMR I-02 SEBIO, FR CNRS 3730 SCALE, 76600 Le Havre, France

²Université de Reims Champagne Ardenne, URCA, UMR I-02 SEBIO, 51097 Reims, France*

Author to whom correspondence should be addressed.

Environments **2020**, 7(6), 46; <https://doi.org/10.3390/environments7060046>

Received: 11 May 2020 / Revised: 11 June 2020 / Accepted: 13 June 2020 / Published: 16 June 2020

Abstract

Toxic metals remain a current important threat to aquatic ecosystems, despite regulatory efforts to reduce their release. Several toxic metals already appear in the list of priority substances polluting surface waters, while concerns arise from the increasing use of technology-critical metals such as metallic nanoparticles, rare-earth, and platinum group metals. In aquatic environments, various chemical, biological and physical processes determine the impact of metals on the biota. This review provides insights into responses to toxic metals recently reported in freshwater and marine animals. The specific emphasis is on: (i) common cellular and molecular responses; (ii) stress proteins; (iii) redox homeostasis; (iv) cytoskeleton rearrangement; (v) metabolism reshuffle; (vi) free cellular energy and mitochondrial metabolism; and (vi) immunity. These endpoints are promising, notably in multi-biomarker approaches to identify precise cellular toxicity pathways and anticipate the impact of environmental metal pollution.

Keywords: [bivalve](#); [cytoskeleton rearrangement](#); [free cellular energy and mitochondrial metabolism](#); [metabolism reshuffle](#); [redox homeostasis](#); [stress protein](#)

Introduction

Although considerable efforts for reducing pollutant release have been made, contamination in surface waters is still of concern. In this context, a deeper understanding of contaminant flux, dynamics, and impact on biota in aquatic systems are needed to better predict their response to changing conditions and efficiently anticipate risks for ecosystems. Nearly all water bodies are contaminated to some level with transition metals, such as cadmium (Cd), lead (Pb), and mercury (Hg), due to anthropogenic sources [1,2]. Transition metals may or may not have an essential biological role. For example, copper (Cu) is essential to all animals as it participates in fundamental physiological processes (e.g., mitochondrial respiration) and is a cofactor for many enzymes, e.g., superoxide dismutases (SOD) and cytochrome c oxidases (CCOX) [3]. Because of its high reactivity, Cu concentration is tightly regulated inside cells by a complex homeostasis network [4]. This homeostasis network has been studied in several model species and there is evidence of high conservation throughout evolution [5,6]. However, Cu in excessive concentrations causes oxidative stress due to adverse effects on the above-mentioned necessary cellular processes, such as enzyme activity and the electron transport chain [7,8,9]. Similarly, nonessential metals such as Cd are also highly reactive with cellular components and are toxic to cells at low concentrations. Nonessential metals are generally taken up through essential metal homeostasis networks. In different species, metals will bioaccumulate variably in different organs. Moreover, some metals are more toxic than others in different species. For example, mussels seem more sensitive to Cu than to Cd [10].

Metal concentrations are consequently an important parameter for environmental quality in natural environments. Elevated metal concentrations in aquatic ecosystems are directly related to human activities involving the production of industrial (e.g., pesticide use and agricultural run-off, mine tailings) and domestic wastes (e.g., urbanization, automobile exhausts). In pristine and lightly contaminated

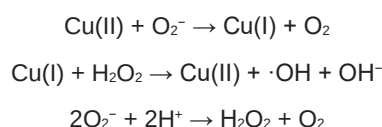
systems, the total metal concentration ranges are 100–500 ng Cu/L, 30–200 ng Zn/L, 10–70 ng Cd/L, and 0.05–4.0 ng Hg/L, but total concentrations in oxic surface waters can easily reach 2000 ng Cu/L, 560 ng Zn/L, 350 ng Cd/L and 100 ng Hg/L and higher in severely contaminated sites. However, many toxic metals and metalloids that enter aquatic systems are absorbed into suspended particles or dissolved organic matter prompting their accumulation in surficial sediments and reducing their bioavailability [11,12]. Bioavailability is the proportion of total metals that can be incorporated into biota (bioaccumulation). Knowledge of geochemical parameters in both water and sediment is necessary to understand controls on metal bioavailability and subsequent toxicity in natural waters. Bioavailability studies indicate that aquatic organisms uptake free metal ions (metal hydroxides) from solution quite efficiently and models such as the Biotic Ligand Model were developed to estimate metal bioavailability and subsequent toxicity [13]. Nonetheless, some metals (e.g., Hg) and many biological factors impacting metal bioaccumulation in aquatic organisms in natural waters are not well modeled, limiting the prediction of metal toxicity [13]. However, acute toxic concentrations of dissolved metals resulting in obvious and rapid systemic toxicity (i.e., on survival, growth, and/or reproduction) are uncommon in oxic surface waters. Nevertheless, these metals in environmental concentrations are bioaccumulated and can directly affect aquatic species [14,15].

Ecotoxicology aims to study the effects of toxic substances on the health of ecological systems and their constituent species. In the environment, toxic substances generate adverse effects at all levels of biological organization, from the molecular level to communities and ecosystems. It is hypothesized, for example, in the adverse outcome pathway theory, that cascading chains of causal events occur at different levels of biological organization, i.e., molecular events producing a measurable ecotoxicological effect. In this context, current research priorities in ecotoxicology are to understand mechanisms by which contaminants disturb normal biological performance at a sublethal level relevant in chronic exposure scenarios, and to use this knowledge to develop new early-warning biomarkers.

In recent years, early, specific and robust biomarkers directly linking responses at cellular levels to the whole organism, population, and community-level effects have been envisioned. The development of multi-biomarker strategies that allow the simultaneous monitoring of a wide range of biological responses is seen as useful for improving environmental hazard assessment in widespread non-model sentinel species to generalize the use of these techniques in field applications. Integrating data obtained on different levels of the cellular cascade triggered by a pollutant gives a more complete picture of the health status of an organism. In this context, this paper reviews a set of cellular biomarkers that are seen as promising to assess early cellular toxic effects in aquatic animals, in light of recent researches.

A Common Response to Toxic Metal Exposure

Once metal toxicity is established, a similar chain of events linked to oxidative stress sets in motion at the subcellular level: the formation of metal-rich granules and the increased production of free radicals, either strictly by the direct effect of a reactant with the metal or by the indirect response to an increase in metal cellular concentration. The production of reactive oxygen species (ROS) has several cellular effects on aquatic species. For example, Cu generates free radicals through the Fenton and Haber-Weis reaction:



By contrast, Cd, which is not a Fenton metal, generates them indirectly [16]. For example, in copepods, 100 µg/L of Cu for four days trigger a significant production of ROS, but a similar exposure to Cd does not [17]. However, an overproduction of ROS induces redox homeostasis disturbances and macromolecule damage. For instance, Cu and Cd exposure induced DNA damage and hedgehog cells (i.e., heavily DNA damage cells) in medaka larvae [18], likely due to ROS overproduction as shown in rainbow trout [19,20] and/or to the inhibition of DNA repair mechanisms [21,22,23]. Moreover, an excess of metal ions can cause protein mismetallation resulting in a loss of function of proteins [24], further

increasing cellular damage. Metal toxicity (specifically Cd) has recently been reviewed by Zhang et al. [25] and will not be detailed here.

Cellular defense mechanisms against toxic metals include canonical antioxidant systems aimed at capturing and neutralizing ROS and more metal-specific responses like sequestration by metallothioneins or into lysozymes. The latter is related to the cell's ability to detect the presence of metals. Cellular metal overload sensing mainly relies on MTF-1 (metal response transcription factor 1) as recently reviewed by Park et al. [26]. This TF was first described in mammals and more recently identified in aquatic species such as oysters and tilapia [27,28]. Briefly, activation of MTF-1 triggers its nuclear translocation; the TF can then bind to metal response elements and activate downstream gene expression, for instance, metallothionein encoding genes. In addition, cross-regulation between metal-response pathways and heat stress response (HSR) has been highlighted [26], suggesting a synergistic response to metal stress.

In the context of environmental risk assessment, stress response biomarkers can be categorized as (i) overexpression of stress proteins, i.e., metallothioneins and chaperones, (ii) redox homeostasis alteration, (iii) cytoskeleton rearrangement, i.e., toxic effects and resistance effects prompting differences in the cell structure, (iv) disruption of metabolic homeostasis, (v) free cellular energy as well as mitochondrial metabolism, and (vi) immunity modulation.

Overexpression of Stress Proteins

Metallothioneins

Metallothioneins (MTs) are a highly conserved family of small cysteine-rich proteins implicated in metal binding, such as Zn or Fe, and responses to metal stress (Table 1). These proteins have been described extensively in aquatic species, e.g., marine bivalves [29,30], seawater shrimps *Palaemonetes argentinus* [31], copepods [17], freshwater gammarids and teleostean fish [32].

Table 1. Summary of studies describing metal impacts on stress proteins, i.e., metallothioneins (MTs) and Heat Shock Proteins (HSPs).

Species	Metal	Concentration	Duration	Effect	
<i>Crassostrea virginica</i> (cell primary culture)	Cd	5.6 to 22.4 µg/mL	4 h	Gill cells: ↑HSP60 and HSP70. HSP70 shows a strong correlation with Cd concentrations. Hepatopancreas cells: higher uptake, but HSP70 was unchanged	[50]
<i>Crassostrea hongkongensis</i>	Zn, Cd, Cu (field)	n.a.	2 months (caging)	Zn exposure: ↑Cu and Cd uptake and ↑MT	[36]
<i>Echinogammarus acarinatus</i> , <i>Gammarus balcanicus</i> , <i>Salmo trutta</i>	Cd, Cu (field)	n.a.	lifetime	Contaminated sites: ↑MT levels Contaminated sites: ↑MT levels Intestine: ↓metal content linked to detoxication abilities	[32]
<i>Mytilus edulis</i>	Cd, Cu, Zn (field)	n.a.	8 months (caging)	In digestive gland MT abundance is linearly correlated to metal concentration, but not in gills; Seasonal modulation of MT abundance but metal-induction remains measurable	[35]
	Cu, Cd	10 µg/L, 100 µg/mussel	7 days	Resistant populations induce more HSP70 than sensitive ones	[45]
	Cu	100 µg/L	7 days	↑HSP70 and ↑HSP60	[43]
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Ag (NP)	10 µg/L	96 h	↑MTs and ↑MT10 gene; no effect on MT20 gene	[29]
<i>Ostrea edulis</i>	Cd Zn Zn, Cd	500 µg/L 500 µg/L 500 µg/L each	7 days	Gills and digestive gland: ↑MT and HSP70 No effect Gills and digestive gland: ↑MT and ↑HSP70	[34]
<i>Palaemonetes argentinus</i>	complex metal mixture (field)	n.a.	96 h (caging)	Cephalothorax: ↑MT correlated significantly to Cd	[31]
<i>Tigriopus japonicus</i>	Cd, Cu	5 to 100 µg/L	96 h	hsp genes HSP20 and HSP70 are upregulated	[17]
<i>Sparus aurata</i>	Cd	1.25 mg Cd/kg body mass (injection)	7 days	Strong ↑HSP70 in the kidney; ↑HSP90 in liver	[44]

NP, nanoparticles. n.a., non-available data.

MTs are widely used as an environmental surveillance tool. Their expression is highly correlated with metal concentrations in the medium, although the induction threshold varies according to metals [26,33]. MTs binding capacity can also be modified by different abiotic factors, e.g., temperature [34]. In coastal areas, *Mytilus* sp. has been identified as a model species that reflects a linear relationship between MT production and toxic metal exposure: mussels transplanted to a metal-rich site during eight months, exhibited an increase in MTs content. In digestive glands, MTs and metal concentrations were strongly correlated and remained observable throughout the study, despite seasonal variations [35]. Metal cross-influences have also been studied and a correlation between Zn, Cu, and Cd uptake was demonstrated in bivalves [36]: Zn-exposed oysters *Crassostrea hongkongensis* showed higher bioaccumulation of Cu and Cd. Authors hypothesized that Zn induced MT production that also had a high affinity with other metals resulting in increased polymetallic bioaccumulation.

Most aquatic species display a rise in expression of MTs at the transcriptional and proteic levels when exposed from 30 ng/L to 500 mg/L of Cd and Cu [29,32,34]. For example, freshwater mussels *Dreissena r. bugensis* show a four-fold increase in MTs when exposed to 50 or 100 µg/L of Cd for seven days [37]. *Mytilus* spp. require higher metal concentrations to induce MTs and therefore seem particularly resistant to this metal toxicity. Mussels also have a second defense line against toxic metal poisoning that is biomineralization [38]. In higher vertebrates, the quickest upregulation of MT appears in gastrointestinal tissue, gills, and other organs known to be involved in detoxification processes [32]. Since the aforementioned review, protein expression variations have been found to be species-specific and seem to be linked to the physiological state of the organism [35]. For example, size and season impact the production of MT in exposed freshwater species [32,35].

HSP

Heat shock proteins (HSPs) were first discovered in a thermal regulation experiment context. They form a family of proteins involved in folding, refolding, and remodeling during protein synthesis [10,39]. These proteins have been reviewed in fish and bivalves by Basu et al. [40] and Fabbri et al. [41], respectively. With its inducible and constitutive isoforms, HSP70 is the most studied of the HSP family and has been described in the cytosol, mitochondria, and the endoplasmic reticulum [40]. Depending on the species, HSPs show different responses to toxic metal exposure (Table 1). For instance, HSP60 avoids misfolding whereas HSP70 prevents aggregation in stress situations.

Toxic metals have been shown to bind to HSPs, inhibiting their function and causing protein misfolding. As such, the modulation of HSP's expression reflects the level of damage of tissues in mussels and crustaceans [17,42,43].

In fish, three HSPs have been described in a metal contamination context: HSP50, HSP70, and HSP90. Briefly, HSP50 interacts with the endoplasmic reticulum (ER) and functions in the procollagen helix assembly. HSP90 exhibits cytosolic and nuclear locations with the additional roles of signal transduction and transcriptional activation [40]. The abundance of these HSPs is variable throughout the whole organism. In *Sparus auratus* for instance, intraperitoneal Cd injection (1.25 mg Cd/kg body mass) triggers tissue-specific responses with HSP90 and HSP70 being more abundant only in liver and kidney, respectively, and show no significant variation in gills [44].

HSPs expression as general stress biomarkers has been extensively studied in invertebrates. In oysters, overexpression of HSP60 and HSP70 mRNA and proteins were documented in concentrations ranging from 100-500 µg/L of Cd [44]. Primary cell cultures isolated from gill or hepatopancreas were submitted to a short Cd exposure (4 h, 5.6 to 22.4 µg/mL). HSP70 and HSP60 exhibited a similar response pattern with an increased abundance in gill cells but not in hepatopancreas cells, while HSP90 level was not modified in both cell types. One part of this study focused on Cd's impact on cell metabolism and will be described in a forthcoming paragraph. In *Mytilus* spp., an increased abundance of HSP70 and HSP60 were described in presence of 100 µg Cd/mussel for seven days [45] and 10 µg Cu/L for seven days [43], respectively. In small crustaceans, i.e., *Tigriopus japonicus*, HSP20 and HSP70 mRNA were overexpressed when exposed to 100 µg/L and 50 µg/L respectively for 96 h to most metals, including Cu and Cd [17]. Moreover, this study highlights a downregulation of the HSP40 gene when exposed to 100 µg/L of Cd and Cu, a potential biomarker for

toxic metals. In this species, Cu-induced overproduction of most *HSP* mRNAs (except the aforementioned *HSP40* gene) and Cd-induced *HSP20*, *HSP70*, and *HSP90* genes and a downregulated *HSP10* gene.

Redox Homeostasis Disturbance

As mentioned above, metal toxicity induces ROS production. When cell defense capacities are overwhelmed, ROS may trigger oxidative stress. Antioxidant enzymes, such as superoxide dismutases (SOD), catalases (CAT) or antioxidant molecules such as glutathione (GSH), are widely used as molecular markers for metal exposure monitoring, alone or in combination with multi-biomarker approaches (Table 2). Scientists also track macromolecular and cellular damages. In animal cells, the mitochondria are very often analyzed, showing destabilization and function modification due to oxidative stress resulting from toxic metals [16,46]. This destabilization has direct consequences on cellular respiration (see Section 7). At the cellular level, lipid peroxidation and lysosomal activity can be affected by metal toxicity [16,46]. These effects have been reviewed in *Mytilus* spp. [47].

Table 2. Summary of studies describing metal impacts on redox homeostasis disturbance.

Species	Metal	Concentration	Duration	Effect	
<i>Mytilus edulis</i>	Cu, Cd, Zn	40 µg/L	6 days	↓GSH in gill and hepatopancreas with Cu or Cd, but not with Zn	[49]
	Cu	25 µg/L	7 days	↑SOD activity for the three identified isoforms	[47]
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Cd (field)	n.a.	lifetime	Gills: ↑CAT activity and high lipoperoxidation at polluted sites	[53]
<i>Spurus aurata</i> Leukocytes	Cd	5.6 mg/L	2 h	↑CAT gene; no SOD gene expression modification	[51]
Fibroblast cell line SAF1	Cu, Cd	15.9 mg/L, 1.12 mg/L	24 h	No SOD gene expression modification	[46]
<i>Tigriopus japonicus</i>	Cd, Cu	100 µg/L	96 h	↑GST and SOD activities; ↑GSH with Cu treatment but not with Cd	[17]

n.a., non-available data.

Effects of Cd on reduced glutathione (GSH), a major non-enzymatic compound of antioxidant defense, are well documented and have been reviewed by Nuran et al. [48]. In *Mytilus edulis*, a metal-specific response was identified when exposed to Cu at 40 µg/L for six days, with a GSH decrease (–25%) in the digestive gland and gills, but no significant variation when exposed to 40 µg/L of Cd or Zn [49]. A decrease in GSH was also observed in *C. virginica* gill and hepatopancreas cell cultures in response to Cd exposure (four hours at 22.4 µg/mL; [50]). By contrast, in the copepod *T. japonicus*, 100 µg/L of Cu during 96 h increased GSH content [17], but 100 µg/L of Cd had no effect. Moreover, in both exposures, increased activities were observed for GST (glutathione S transferases), GR (glutathione reductases), and SOD enzymes. SOD proteins are the first defenses against ROS damages. In *Mytilus* spp., three isoforms have been characterized in response to Cu (25 µg/L for seven days; [47]). Transcriptomic studies on sea bream cell cultures exposed to toxic metals revealed contrasted results: for example, no SOD gene expression modification was detected by DNA microarray in the fibroblast cell line (SAF1) following a 24 h exposure to Cu or Cd (15.9 mg/L and 1.12 mg/L, respectively) [46]. *SOD(Mn)* and *SOD(Cu)* gene transcription levels were not significantly modulated in medaka larvae and embryos following exposure to Cd-spiked sediments [21]. Similar results were reported in isolated leukocytes exposed to higher concentrations of Cd but for shorter times (5.6 mg/L for two hours), while CAT mRNA expression was enhanced [51]. Indeed, CAT protein has been described as a sensitive biomarker to toxic metals [52]. A three-year field study concerning *Mytilus* spp. issuing from contrasted metal contamination sites seems to confirm CAT protein level robustness [53].

Cytoskeleton Rearrangement

The cytoskeleton can be defined as proteins that structure the cell through three main networks: microtubules (tubulin), microfilaments (actin), and intermediary filaments (filamin and lamin). The cytoskeleton is implicated in molecule transport and in signaling via vesicular trafficking. Studies have demonstrated cytoskeleton disruption due to metal exposure (Table 3) [10].

Table 3. Summary of studies describing metal impacts on cytoskeleton rearrangement.

Species	Metal	Concentration	Duration	Effect	
<i>Carassius auratus gibelio</i> , <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Cu	50 µg/L	3 days	↓Actin in common carp and rainbow trout ↑F- actin capping protein subunit β in common carp only	[55]
<i>Mytilus edulis</i>	Cd, Cu, Pb, Zn, PAHs (field)	n.a.	lifetime	↑actin carbonylation (gills) and ↑glutathionylation (digestive gland) in polluted sites	[90]
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (cell primary culture)	Cu, Cd	5.6 to 112 mg Cd/L; 3.18 to 12.72 mg Cu /L	24 h	Hemocytes: actin cytoskeleton alteration	[54]
	Cu	10 µg/L	15 days	Gills: ↓actin; Digestive gland: ↓actin, ↑tubulin	[56]
<i>Saccostrea glomerata</i>	Cd, Cu, Pb, Zn	5, 50, 100 µg/L	4 days	↓Actin (Cu and Zn), ↑actin (Pb) or nor modified (Cd)	[57]

n.a., non-available data.

In hemocytes isolated from *Mytilus* spp., actin immunostaining revealed a modified cellular distribution of filaments after Cd and Cu exposure, evidencing cytoskeleton disruption [54]. For lower tested concentrations (5.6 mg Cd/L; 3.18 mg Cu/L), the actin cytoskeleton was increased in the perinuclear zone and reduced in the cortical cell areas. At higher tested concentrations (112 mg Cd/L; 12.72 mg Cu/L), microfilaments appeared less developed and cells exhibited a round shape [54]. Whether these effects are direct or indirect is yet to be determined. Indeed, disturbance of the cytoskeleton is mainly documented by proteomic studies that show variations in the abundance of cytoskeletal elements. In fish, for instance, effects of Cu (50 µg/L, three days) on gill proteomes have revealed species characteristic profiles: actin is decreased in common carp and rainbow trout but shows no modification in gibel carp. Furthermore, F-actin capping protein subunit β is more abundant in gills of gibel carp but not in the two other analyzed species [55]. Tissue-specific responses were observed in *M. galloprovincialis* exposed to Cu (10 µg/L, 15 days): actin abundance was reduced in gills and hepatopancreas, while β-tubulin was upregulated only in the latter [56]. In rock oysters, a metal-specific response was described following a four-day exposure to Cd, Cu, Pb or Zn (5, 50, 100 µg/L): actin, for instance, was downregulated by Cu (5 µg/L) and Zn (100 µg/L), upregulated by Pb (100 µg/L), and not affected by Cd [57].

6. Metabolism Reshuffle

Metal toxicity increases energy demand requiring higher ATP production [58]. A widely observed cellular response consists of switching from an aerobic to an anaerobic metabolism producing more ATP (Table 4). This can be triggered by the aforementioned oxidative stress, caused directly by redox metals or indirectly by non-redox metals. This metabolism switch seems to be supported by increased glucose levels and decreased glycogen reserves in fish treated for 10 days with 1 mg Cd/L [59]. The maximal aerobic and anaerobic capacities of the first steps of glycolysis can be assessed by the integrative glycolytic flux method [60]. We achieved a laboratory study in freshwater fish revealing a disturbance of aerobic metabolism in juvenile *Rutilus rutilus* exposed to Cu. During this experiment, juvenile fishes were exposed to 0, 10, 50, and 100 µg/L of Cu for seven days. At 50 µg Cu/L, the glycolytic flux measured in white muscle compared to control, revealed a downward trend in anaerobic flux after one day and an upward trend after seven days, while the aerobic flux remained unchanged throughout the whole exposure [61]. These data suggest a potential switch to anaerobic metabolism induced by Cu in juvenile roaches. Concomitantly, an increased expression of the *CCOX1* gene was observed, while adenylate energy charge was maintained (AEC > 0.7) after one day (T1) despite a decrease in ATP concentration [62,63]. After seven days, however, AEC decreased with increasing concentrations of Cu (AEC < 0.7), while the increase in expression of *CCOX1* was lowered compared to T1. Taken together, these observations support that roaches were first able to cope with Cu exposure maintaining their aerobic metabolism. Eventually, after one week of exposure, organisms seem unable to compensate for this stress and anaerobic metabolism was thereafter mobilized (Figure 1) [61]. Nevertheless, ATP production in bivalves has been described as decreased by metals, with 6-phosphofructokinase (PFK)/pyruvate kinase (PK) ratio decreasing when exposed to Cd (50 µg/L) for 10 days [64,65], a mechanism that is in accordance with the ATP/ADP decrease observed in green mussels

exposed seven days to Cd (20 $\mu\text{g/L}$) and/or Cu (50 $\mu\text{g/L}$) using metabolomic strategy [66]. However, in some species such as clams, ATP production is maintained during Cu (150 $\mu\text{g/L}$) exposure, probably due to anaerobic metabolism stimulation, in most tissues except hemolymph [67]. Moreover, the oxidation of NADH during electron transport is affected by Cd [37]. In fish, Cd treatment can inhibit Na^+/K^+ -ATPase activity and expression in the major osmoregulatory organs: gills and kidneys [44]. Cu impacts the early stages of glycolysis and for instance, has been shown to inhibit hexokinase and phosphofructokinase activity in concentrations as low as 10 $\mu\text{g/L}$ in mussels [68]. Interestingly, in mammals, PFK can counteract both Cu and Cd effects on the cytoskeleton [69].

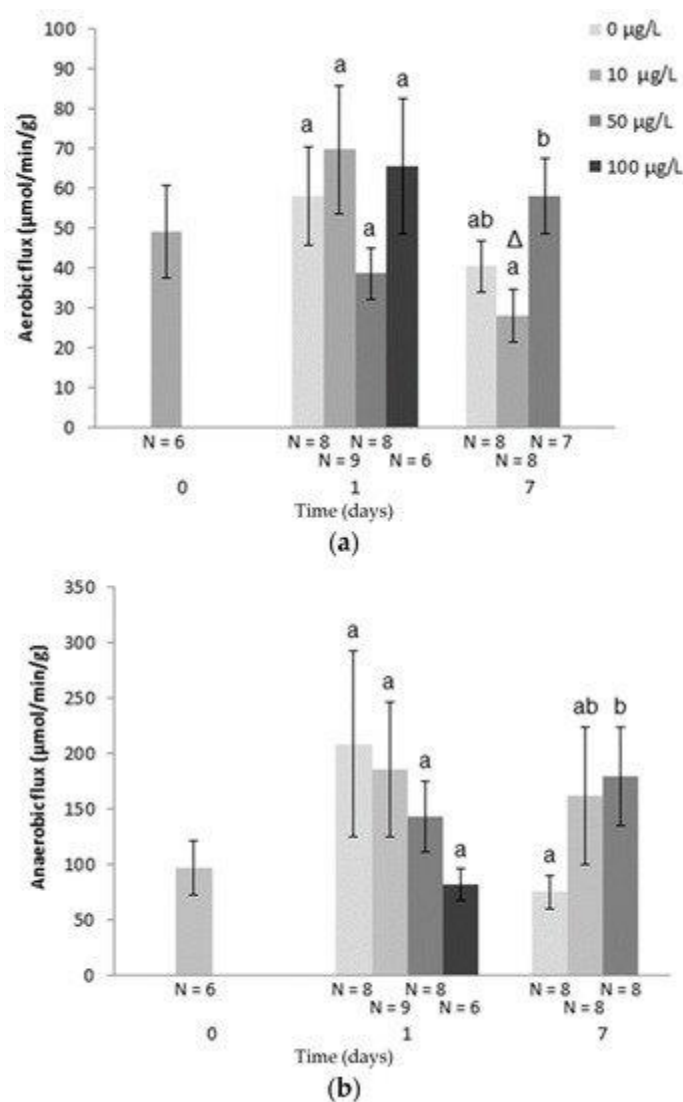


Figure 1. (a) Aerobic flux ($\mu\text{mol/min/g}$) and (b) anaerobic flux ($\mu\text{mol/min/g}$) in white muscle of juvenile roach during Cu exposure. Bars represent S.E. Different letters indicate significant differences for the same time point. Δ indicates significant differences for the same concentration among individual samples at T1 and T7.

Table 4. Summary of studies describing toxic metal impacts on metabolism reshuffle.

Table 4. Summary of studies describing toxic metal impacts on metabolism reshuffle.

Species	Metal	Concentration	Duration	Effect	
<i>Crassostrea virginica</i>	Cd	22 mg/L	4 h	↑Metabolism rate	[58]
<i>Cyprinus carpio</i>	Cd	1 mg/L	10 days	↓Glycogen levels	[59]
<i>Dreissena bugensis</i>	Cd	100 µg/L	7 days	NADH oxidase activity is negatively correlated with the accumulation	[37]
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Cu	80 µg/L	7 days	↓Protein synthesis	[65]
	Cd, Cu	40 mg/L	3 days	↓hexokinase activity by 35% (Cu)	[68]
<i>Perna viridis</i>	Cd, Cu	50 µg/L, 20 µg/L respectively	7 days	Both metals alone or in combination ↑glycogen, ↑NAD, ↑lactate and ↓ATP/ADP	[66]
<i>Sparus aurata</i>	Cd	1.25 mg Cd/kg body mass (injection)	7 days	↓activity and expression of Na ⁺ /K ⁺ -ATPase in the major osmoregulatory organs, gill, and kidney	[44]
<i>Tegillarca granosa</i>	Cd	50 µg/L	10 days	↓PHK and ↓PK activities to 70% of the control	[64]

n.a., non-available data.

7. Impacts of Metals on Free Cellular Energy and Mitochondrial Metabolism

Energy metabolism provides particularly relevant information about stress responses and tolerance (**Table 5**). The balance between energy demand and energy supply is critical for the survival of organisms facing environmental stressors such as metal toxicants. Metal contamination increases energetic costs of cell maintenance to ensure protection, detoxification as well as repair (see above), and finally survival [70,71]. The scope for growth measurement (SFG) reflects energy allocation to growth and reproduction. SFG in aquatic organisms shows that metal exposure shifts the use of the energy towards the implementation of defense mechanisms (see references in [72,73]). Indeed, in freshwater mussels *Dreissena polymorpha* exposed to 10 µg Cd/L in controlled conditions, SFG decreased after 90 min [74]. At the cellular level, the mitochondrion is the key organelle for free energy synthesis as respiratory chain and oxidative phosphorylation provide ATP supply. Mitochondrial electron transport system activity is altered by metal exposure as evidenced by the decrease observed in juvenile roach exposed for one day to 100 µg Cu/L [62]. The activity of respiratory chain enzymes varies depending on the complexes they form. For instance, in rainbow trout mitochondria exposed in vitro to Cu (0–1.3 mg/L), complex I and III basal respiration rates were stimulated while complex II and IV basal respiration rates were inhibited [75]. In mollusks such as marine clams, succinate dehydrogenase (complex II) activity is similarly inhibited in mitochondria in vitro exposed to Cu (5 mg/L) [76]. In eastern oysters, sensitivity and response differences to Cd were also observed between electron transport chain complexes [58]. However, in the same species, metals were shown to induce a decrease of the whole mitochondrial respiration rate [77,78]. Free energy availability is consequently depressed, as reflected by the ATP/ADP ratio and the AEC decline in Cd (25 µg/L; three weeks) exposed oysters [77]. Such a decline of ATP concentration is also observed in oyster hemocytes exposed to Cd (0–22.5 mg/L) [79]. Cd effect on mitochondrial bioenergetics depends on the concentration: an increase of proton leak is observed in oysters' isolated mitochondria exposed to 112.4–562 µg/L of Cd with no effect on ADP-stimulated state 3 respiration rates, while the reverse is observed at 1.12–5.62 mg/L of Cd with the inhibition of state 3 respiration [80]. However, if they are all inhibited in Cd exposed oysters, mitochondrial matrix enzymes, such as citrate synthase or isocitrate-dehydrogenase, are more sensitive to Cd than the membrane enzymes of the respiratory chain complexes [58]. The disturbance of energy metabolism in Cd exposed oysters can differ from their isolated mitochondria, but both support complex phenomenon implying diverse enzymatic impairments [78]. Finally, exposure to a metal such as Cd in oysters, decreases the activation energy of most mitochondrial enzymes, consequently limiting the ability of organisms to face additional environmental stress such as temperature increase [58]. The metabolic effect of metals can also be assessed at the molecular level targeting the same pathways. Indeed, expression of genes involved in cellular energy metabolism, notably in the respiratory chain, may also give relevant information on stress responses. For example, under laboratory conditions, the expression of the CCOX gene increased in several species of freshwater and marine mollusks exposed to Cd [81] and in zebra mussels exposed to different metals [82].

Table 5. Summary of studies describing toxic metal impacts on free cellular energy and mitochondrial metabolism.

Table 5. Summary of studies describing toxic metal impacts on free cellular energy and mitochondrial metabolism.

Species	Metal	Concentrations	Duration	Effect	
<i>Crassostrea virginica</i>	Cd	45 mg/L	Assay duration	Activity of mitochondrial complexes I to IV: ↓ or ↑ depending on the complex (gills and hepatopancreas)	[58]
<i>Crassostrea virginica</i>	Cd	50 µg/L	30 days	Gills mitochondria: ↓Mitochondria ADP-stimulated respiration rate	[78]
<i>Crassostrea virginica</i>	Cd	25 µg/L	21 days	Gills mitochondria: ↓Mitochondria ADP-stimulated respiration rate Gills: ↓ATP/ADP; ↓AEC	[77]
<i>Crassostrea virginica</i> In vitro exposed mitochondria	Cd	5,62 mg/L	Assay duration	↓Mitochondrial respiration rates (gills mitochondria)	[80]
<i>Crassostrea virginica</i> In vitro exposed hemocytes	Cd	22.5 mg/L	72 h	↓ATP	[79]
<i>Dreissena polymorpha</i>	Cd	10 µg/L	7 days	↓SFG after 90 min ↑SFG after 7 days	[74]
<i>Mesodesma mactroides</i> In vitro exposed mitochondria	Cu	5 mg/L	1 h	↓Succinate dehydrogenase activity (gills and digestive gland mitochondria)	[76]
<i>Oncorhynchus mykiss</i> In vitro exposed mitochondria	Cu	0.32, 0.64, 1.27 mg/L	Assay duration	Liver mitochondria respiratory chain complex: ↑Complex I and III basal respiration rates ↓Complex II and IV basal respiration rates	[75]
<i>Rutilus rutilus</i>	Cu	100 µg/L	7 days	↓ETS after 24h (white muscle)	[62]

8. Impacts of Metals on Immunity

Immunity is a physiological system involved in the organism's main homeostatic functions. Its role in anti-pathogen defense (against bacteria, viruses, fungi, etc.) is widely known, but it is also implicated in the tissue remodeling regulation, associated with reproduction, growth, development, and in stress response. Its role in organism integrity maintenance gives it a central position in physiology. Metal toxicity results in immune function modulation in aquatic organisms, involving immune parameter inhibition and/or stimulation of cellular and molecular immunological functions.

Cu increases leucocyte oxidative activity in carp (*Cyprinus carpio*) exposed from four to eight days to metal at environmental concentrations (100 and 250 mg/L in the Champagne region, France) [83]. The humoral immune factor responses of Cu-treated carp were modulated by the presence of a parasite (*Ptychobothrium* sp.), as shown by a high increase in lysozyme activity observed in parasitized carp after exposition [84]. Similar responses were observed in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to environmental concentrations of Al [85]. A significant pro-oxidant effect was observed in head kidney leukocytes of roach exposed to 100 µg Al/L for two days. These pro-oxidant effects were higher in fish whose immunity was stimulated with LPS-bacterial endotoxin. These results demonstrate that environmental concentrations of Al induce oxidative and immunotoxic effects in fish and are associated with an immunomodulatory process in relation to inflammatory responses.

Co-exposure of fish to both chemical and biological (parasitic) stress may increase the effects of metals exposure. Identical observations were made in other fish species in laboratory studies [86]. The central question of the environmental reality of these fish responses in their natural environment has rarely been studied to date [87].

9. Conclusions

In recent years, responses to toxic metals in aquatic animals were studied in various experimental conditions which helped to confirm that they trigger common toxicity pathways. In this context, various datasets showed that molecular regulation at the gene, protein, and metabolite level indicated physiological adaptation. Metals induce an early response as evidenced by alterations both at structural and functional levels of different organs, including enzymatic and genetic effects. Thus, they affect redox homeostasis, energy metabolism, and the innate immune system of exposed biota and/or potentially increase susceptibility to multiple types of disease (Figure 2). Moreover, the analysis of these endpoints, notably in multi-biomarker strategies, seems highly promising in identifying molecular signatures that will allow the early and sensitive detection of metal contamination. Nevertheless, further work is needed to efficiently use these molecular and cellular responses to enable risk assessment in the environment at population and community levels. To reach this aim, an effort to better link biomarker responses with whole-organism impact has to be a research priority notably to take into account biological variability

and the influence of confounding factors [88]. Biomarkers are valuable tools for the implementation of guidelines for effective environmental management as they offer additional biologically and ecologically relevant information. However, biomarker validation in wild populations is necessary, to normalize background levels and eventually to complement standard tests to increase relevant legislation regarding the protection of aquatic environments [89].

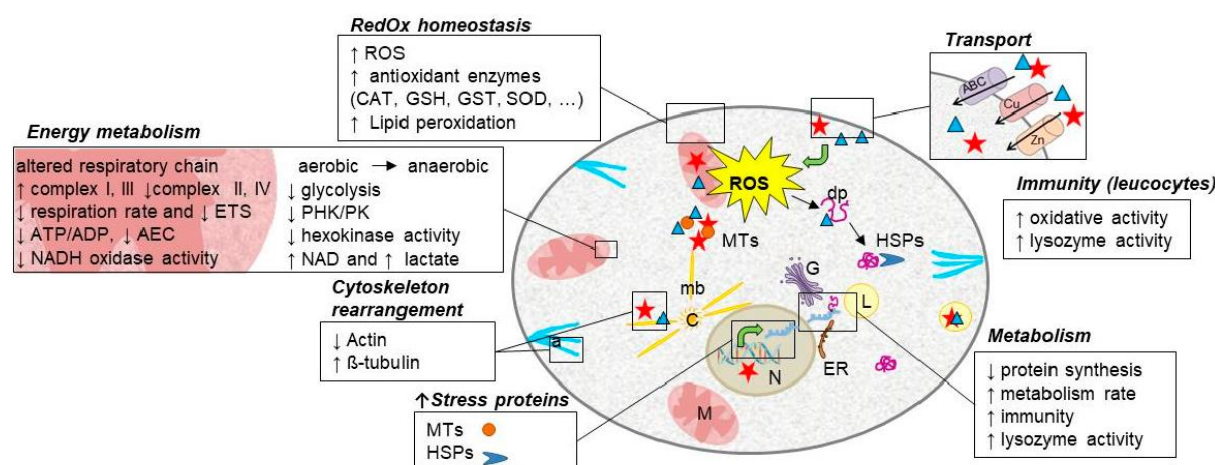


Figure 2. Exposure to toxic metals in aquatic animals triggers common toxicity pathways (ABC: ABC transporter; a: actin; C: centrosome; dp: denatured protein; L: lysosome; ER: endoplasmic reticulum; G: Golgi; HSPs: heat shock proteins; M: mitochondria; mb: microtubules; MTs: metallothioneins; N: nucleus; ROS: reactive oxygen species).

Author Contributions

Writing—review A.L.S., E.D., S.B., F.B., B.R., I.B.; writing—review and editing C.C.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Azimi, S.; Rocher, V. Influence of the water quality improvement on fish population in the Seine River (Paris, France) over the 1990–2013 period. *Sci. Total Environ.* **2016**, *542*, 955–964. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Loizeau, J.; Edder, P.; De Alencastro, L.F.; Corvi, C.; Ramseier Gentile, S. La contamination du léman par les micropolluants—Revue de 40 ans d'études. *Arch. Sci.* **2013**, *66*, 117–136. [[Google Scholar](#)]
3. Castruita, M.; Casero, D.; Karpowicz, S.J.; Kropat, J.; Vieler, A.; Hsieh, S.I.; Yan, W.; Cokus, S.; Loo, J.A.; Benning, C.; et al. Systems Biology Approach in Chlamydomonas Reveals Connections between Copper Nutrition and Multiple Metabolic Steps. *Plant Cell* **2011**, *23*, 1273–1292. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Andrés-Colás, N.; Sancenón, V.; Rodríguez-Navarro, S.; Mayo, S.; Thiele, D.J.; Ecker, J.R.; Puig, S.; Peñarrubia, L. The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J.* **2006**, *45*, 225–236. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Burkhead, J.L.; Reynolds, K.A.; Abdel-Ghany, S.E.; Cohu, C.M.; Pilon, M. Copper homeostasis. *New Phytol.* **2009**, *182*, 799–816. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Page, M.D.; Kropat, J.; Hamel, P.P.; Merchant, S. Two Chlamydomonas CTR Copper Transporters with a Novel Cys-Met Motif Are Localized to the Plasma Membrane and Function in Copper Assimilation. *Plant Cell* **2009**, *21*, 928–943. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
7. Monferran, M.V.; Agudo, J.A.S.; Pignata, M.L.; Wunderlin, D.A. Copper-induced response of physiological parameters and antioxidant enzymes in the aquatic macrophyte *Potamogeton pusillus*. *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 2570–2576. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. Razinger, J.; Drinovec, L.; Zrimec, A. Real-time visualization of oxidative stress in a floating macrophyte *Lemna minor* L. exposed to cadmium, copper, menadione, and AAPH. *Environ. Toxicol.* **2010**, *25*, 573–580. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Upadhyay, R.; Sharma, G.D.; Panda, S. Responses of antioxidant metabolism and defense mechanism of aquatic macrophyte, *Pistia stratiotes* L. to zinc treatment under copper stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* **2011**, *81*, 422–427. [[Google Scholar](#)]
10. Quintá, H.R.; Galigniana, N.M.; Erlejman, A.G.; Lagadari, M.; Piwien-Pilipuk, G.; Galigniana, M.D. Management of cytoskeleton architecture by molecular chaperones and immunophilins. *Cell Signal.* **2011**, *23*, 1907–1920. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
11. Doig, L.E.; Liber, K. Influence of dissolved organic matter on nickel bioavailability and toxicity to *Hyalella azteca* in water-only exposures. *Aquat. Toxicol.* **2006**, *76*, 203–216. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Borch, T.; Kretzschmar, R.; Kappler, A.; Van Cappellen, P.; Ginder-Vogel, M.; Voegelin, A.; Campbell, K.M. Biogeochemical Redox Processes and their Impact on Contaminant Dynamics. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 15–23. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Mebane, C.A.; Chowdhury, M.J.; De Schamphelaere, K.; Lofts, S.; Paquin, P.R.; Santore, R.C.; Wood, C.M. Metal Bioavailability Models: Current Status, Lessons Learned, Considerations for Regulatory Use, and the Path Forward. *Environ. Toxicol. Chem.* **2020**, *39*, 60–84. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. RajeshKumar, S.; Li, X. Bioaccumulation of heavy metals in fish species from the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Toxicol. Rep.* **2018**, *5*, 288–295. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
15. Mahino, F.; Nazura, U.; Mobarak, H. Heavy metal in aquatic ecosystem emphasizing its effect on tissue bioaccumulation and histopathology: A review. *J. Environ. Sci. Technol.* **2014**, *7*, 1–15. [[Google Scholar](#)]
16. Banfalvi, G. Heavy Metals, Trace Elements and Their Cellular Effects. *Cell. Eff. Heavy Met.* **2011**, 3–28. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
17. Kim, B.-M.; Rhee, J.-S.; Jeong, C.-B.; Seo, J.S.; Park, G.S.; Lee, Y.-M.; Lee, J.-S. Heavy metals induce oxidative stress and trigger oxidative stress-mediated heat shock protein (hsp) modulation in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *166*, 65–74. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
18. Barjhoux, I.; Baudrimont, M.; Morin, B.; Landi, L.; Gonzalez, P.; Cachot, J. Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2012**, *79*, 272–282. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

19. Risso-de-Faverney, C.; Devaux, A.; Lafaurie, M.; Girard, J.; Bailly-Maitre, P.G.A.B.; Delescluse, C. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquat. Toxicol.* **2001**, *53*, 65–76. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
20. Bopp, S.K.; Abicht, H.K.; Knauer, K. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquat. Toxicol.* **2008**, *86*, 197–204. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Barjhoux, I.; Gonzalez, P.; Baudrimont, M.; Cachot, J. Molecular and phenotypic responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) early life stages to environmental concentrations of cadmium in sediment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 17969–17981. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mouchet, F.; Baudrimont, M.; Gonzalez, P.; Cuenot, Y.; Bourdineaud, J.; Boudou, A.; Gauthier, L. Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. *Aquat. Toxicol.* **2006**, *78*, 157–166. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
23. Giaginis, C.; Gatzidou, E.; Theocharis, S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *213*, 282–290. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Imlay, J.A. The Mismetallation of Enzymes during Oxidative Stress. *J. Boil. Chem.* **2014**, *289*, 28121–28128. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhang, H.; Reynolds, M. Cadmium exposure in living organisms: A short review. *Sci. Total Environ.* **2019**, *678*, 761–767. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
26. Park, C.; Jeong, J. Synergistic cellular responses to heavy metal exposure: A minireview. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2018**, *1862*, 1584–1591. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Cheung, A.P.-L.; Au, C.Y.-M.; Chan, W.W.-L.; Chan, K.M. Characterization and localization of metal-responsive-element-binding transcription factors from tilapia. *Aquat. Toxicol.* **2010**, *99*, 42–55. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Meng, J.; Zhang, G.; Li, L.; Li, C.; Wang, T.; Zhang, G. Transcription factor CgMTF-1 regulates CgZnT1 and CgMT expression in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) under zinc stress. *Aquat. Toxicol.* **2015**, *165*, 179–188. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
29. Ale, A.; Liberatori, G.; Vannuccini, M.L.; Bergami, E.; Ancora, S.; Mariotti, G.; Bianchi, N.; Corsi, I.; DeSimone, M.F.; Cazenave, J.; et al. Exposure to a nanosilver-enabled consumer product results in similar accumulation and toxicity of silver nanoparticles in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* **2019**, *211*, 46–56. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
30. Roesijadi, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* **1992**, *22*, 81–113. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
31. Bertrand, L.; Monferrán, M.V.; Mouneyrac, C.; Amé, M.V. Native crustacean species as a bioindicator of freshwater ecosystem pollution: A multivariate and integrative study of multi-biomarker response in active river monitoring. *Chemosphere* **2018**, *206*, 265–277. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
32. Mijošek, T.; Marijić, V.F.; Dragun, Z.; Ivanković, D.; Krasnići, N.; Erk, M.; Gottstein, S.; Lajtner, J.; Perić, M.S.; Kepčija, R.M. Comparison of electrochemically determined metallothionein concentrations in wild freshwater salmon fish and gammarids and their relation to total and cytosolic metal levels. *Ecol. Indic.* **2019**, *105*, 188–198. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
33. Bourdineaud, J.-P.; Baudrimont, M.; Gonzalez, P.; Moreau, J.-L. Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie* **2006**, *88*, 1787–1792. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Piano, A.; Valbonesi, P.; Fabbri, E. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress Chaperones* **2004**, *9*, 134–142. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Geffard, A.; Amiard-Triquet, C.; Amiard, J.-C. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2005**, *61*, 209–220. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Liu, F.; Wang, W.-X. Facilitated Bioaccumulation of Cadmium and Copper in the Oyster *Crassostrea hongkongensis* Solely Exposed to Zinc. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 1670–1677. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Hanana, H.; Kleinert, C.; André, C.; Gagné, F. Influence of cadmium on oxidative stress and NADH oscillations in mussel mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2019**, *216*, 60–66. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
38. Amiard, J.; Amiard-Triquet, C.; Barka, S.; Pellerin, J.; Rainbow, P. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* **2006**, *76*, 160–202. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
39. Niforou, K.; Cheimonidou, C.; Trougakos, I.P. Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Boil.* **2014**, *2*, 323–332. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
40. Basu, N.; Todgham, A.; Ackerman, P.; Bibeau, M.; Nakano, K.; Schulte, P.M.; Iwama, G.K. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* **2002**, *295*, 173–183. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
41. Fabbri, E.; Valbonesi, P.; Franzellitti, S. HSP expression in bivalves. *Inf. Syst. J.* **2008**, *5*, 135–161. [[Google Scholar](#)]
42. Pestana, J.L.; Novais, S.C.; Norouzitalab, P.; Vandegehuchte, M.B.; Bossier, P.; De Schamphelaere, K. Non-lethal heat shock increases tolerance to metal exposure in brine shrimp. *Environ. Res.* **2016**, *151*, 663–670. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sanders, B.; Martin, L.; Howe, S.; Nelson, W.; Hegre, E.; Phelps, D. Tissue-Specific Differences in Accumulation of Stress Proteins in *Mytilus edulis* Exposed to a Range of Copper Concentrations. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1994**, *125*, 206–213. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
44. Santos, S.G.G.; Vargas-Chacoff, L.; Ruiz-Jarabo, I.; Varela, J.L.; Mancera, J.; Fontaínhas-Fernandes, A.; Wilson, J.M. Metabolic and osmoregulatory changes and cell proliferation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2011**, *74*, 270–278. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Tedengren, M.; Olsson, B.; Bradley, B.; Zhou, L. Heavy metal uptake, physiological response and survival of the blue mussel (*Mytilus edulis*) from marine and brackish waters in relation to the induction of heat-shock protein. *Hydrobiologia* **1999**, *393*, 261–269. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
46. Minghetti, M.; Leaver, M.; Taggart, J.B.; Casadei, E.; Auslander, M.; Tom, M.; George, S.G. Copper induces Cu-ATPase ATP7A mRNA in a fish cell line, SAF1. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *154*, 93–99. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
47. Manduzio, H.; Monsinjon, T.; Rocher, B.; Leboulenger, F.; Galap, C. Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* **2003**, *64*, 73–83. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

48. Nuran, E.; Hande, G.-O.; Nukhet, A.-B. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Me-tal induced Oxidative Damage. *Curr. Top. Med. Chem.* **2001**, *1*, 529–539. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
49. Viarengo, A.; Canesi, L.; Pertica, M.; POLi, G.; Moore, M.N.; Orunesu, M. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* lam. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **1990**, *97*, 37–42. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
50. Ivanina, A.V.; Cherkasov, A.S.; Sokolova, I.M. Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *J. Exp. Boil.* **2008**, *211*, 577–586. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
51. Morcillo, P.; Cordero, H.; Meseguer, J.; Esteban, M.A.; Cuesta, A. Toxicological in vitro effects of heavy metals on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) head-kidney leucocytes. *Toxicol. Vitro.* **2015**, *30*, 412–420. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Regoli, F.; Pellegrini, D.; Winston, G.W.; Gorbi, S.; Giuliani, S.; Virno-Lamberti, C.; Bompadre, S. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: The relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Mar. Pollut. Bull.* **2002**, *44*, 912–922. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
53. Vlachogianni, T.; Dassenakis, M.; Scoullou, M.J.; Valavanidis, A. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* **2007**, *54*, 1361–1371. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
54. Gómez-Mendikute, A.; Cajaraville, M. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol. Vitro.* **2003**, *17*, 539–546. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
55. Eyckmans, M.; Benoot, D.; Van Raemdonck, G.A.; Zegels, G.; Van Ostade, X.; Witters, E.; Blust, R.; De Boeck, G. Comparative proteomics of copper exposure and toxicity in rainbow trout, common carp and gibel carp. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genom. Proteom.* **2012**, *7*, 220–232. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Gomes, T.; Chora, S.; Pereira, C.G.; Cardoso, C.; Bebianno, M.J. Proteomic response of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to CuO NPs and Cu²⁺: An exploratory biomarker discovery. *Aquat. Toxicol.* **2014**, *155*, 327–336. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
57. Thompson, E.; Taylor, D.A.; Nair, S.V.; Birch, G.; Haynes, P.A.; Raftos, D.A. Proteomic discovery of biomarkers of metal contamination in Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquat. Toxicol.* **2012**, *109*, 202–212. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
58. Ivanina, A.V.; Habinck, E.; Sokolova, I.M. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2008**, *148*, 72–79. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
59. Cicik, B.; Engin, K. The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758). *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* **2005**, *29*, 113–117. [[Google Scholar](#)]

60. Meléndez-Morales, D.; Lugo, P.D.P.; Meléndez-Hevia, E.; Paz-Lugo, P. Glycolysis activity in flight muscles of birds according to their physiological function. An experimental model in vitro to study aerobic and anaerobic glycolysis activity separately. *Mol. Cell. Biochem.* **2009**, *328*, 127–135. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
61. Maes, V. Le Métabolisme Énergétique Chez un Cyprinidé D'eau Douce, le Gardon *Rutilus Rutilus*: Vers le Développement de Nouveaux Biomarqueurs en Lien Avec la Contamination Par des Produits Phytosanitaires. Ph.D. Thesis, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France, December 2014. [[Google Scholar](#)]
62. Maes, V.; Betoulle, S.; Jaffal, A.; Dedourge-Geffard, O.; Delahaut, L.; Geffard, A.; Palluel, O.; Sanchez, W.; Paris-Palacios, S.; Vettier, A.; et al. Juvenile roach (*Rutilus rutilus*) increase their anaerobic metabolism in response to copper exposure in laboratory conditions. *Ecotoxicology* **2016**, *25*, 900–913. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Maes, V.; Vettier, A.; Jaffal, A.; Dedourge-Geffard, O.; Delahaut, L.; Geffard, A.; Betoulle, S.; David, E. Energy metabolism and pesticides: Biochemical and molecular responses to copper in roach *Rutilus rutilus*. *J. Xenobiotics* **2013**, *3*, 7. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
64. Shi, W.; Han, Y.; Guan, X.; Rong, J.; Du, X.; Zha, S.; Tang, Y.; Liu, G. Anthropogenic Noise Aggravates the Toxicity of Cadmium on Some Physiological Characteristics of the Blood Clam *Tegillarca granosa*. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 377. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Viarengo, A.; Pertica, M.; Mancinelli, G.; Capelli, R.; Orunesu, M. Effects of copper on the uptake of amino acids, on protein synthesis and on ATP content in different tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Mar. Environ. Res.* **1980**, *4*, 145–152. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
66. Wu, H.; Wang, W.-X. NMR-based metabolomic studies on the toxicological effects of cadmium and copper on green mussels *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.* **2010**, *100*, 339–345. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
67. Giacomini, M.; Jorge, M.B.; Bianchini, A. Effects of copper exposure on the energy metabolism in juveniles of the marine clam *Mesodesma mactroides*. *Aquat. Toxicol.* **2014**, *152*, 30–37. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
68. Canesi, L.; Ciacci, C.; Piccoli, G.; Stocchi, V.; Viarengo, A.; Gallo, G. In vitro and in vivo effects of heavy metals on mussel digestive gland hexokinase activity: The role of glutathione. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **1998**, *120*, 261–268. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
69. Liliom, K.; Wágner, G.; Pácz, A.; Cascante, M.; Kovács, J.; Ovádi, J. Organization-dependent effects of toxic bivalent ions. *J. Boil. Inorg. Chem.* **2000**, *267*, 4731–4739. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Calow, P.; Forbes, V.E. How do physiological responses to stress translate into ecological and evolutionary processes? *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **1998**, *120*, 11–16. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
71. Sokolova, I.M.; Lannig, G. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: Implications of global climate change. *Clim. Res.* **2008**, *37*, 181–201. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
72. Le Gal, Y.; Lagadic, L.; Lebras, S.; Caquet, T. Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. In *Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux*, 1st ed.; Lagadic, L., Caquet, B., Amiard, J.C., Ramade, F., Eds.; Masson: Paris, France, 1997; pp. 241–285. [[Google Scholar](#)]

73. Mouneyrac, C.; Péry, A. Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. In *Biomarqueurs en Écotoxicologie Aquatique*, 2nd ed.; Amiard, J.C., Claude, A.-T., Eds.; Lavoisier Tec & Doc: Paris, France, 2017; pp. 270–297. [[Google Scholar](#)]
74. Louis, F.; Devin, S.; Giambérini, L.; Potet, M.; David, E.; Pain-Devin, S. Energy allocation in two dreissenid species under metal stress. *Environ. Pollut.* **2019**, *245*, 889–897. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
75. Sappal, R.; MacDougald, M.; Fast, M.; Stevens, D.; Kibenge, F.; Siah, A.; Kamunde, C. Alterations in mitochondrial electron transport system activity in response to warm acclimation, hypoxia-reoxygenation and copper in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.* **2015**, *165*, 51–63. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
76. Jorge, M.B.; Lauer, M.M.; Martins, C.D.M.G.; Bianchini, A. Impaired regulation of divalent cations with acute copper exposure in the marine clam *Mesodesma mactroides*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *179*, 79–86. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Sokolova, I.M.; Sokolov, E.P.; Ponnappa, K.M. Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquat. Toxicol.* **2005**, *73*, 242–255. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Sokolova, I.; Ivanina, A.; Kurochkin, I. Effects of temperature and cadmium exposure on the mitochondria of oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to hypoxia and subsequent reoxygenation. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **2012**, *163*, S8. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
79. Sokolova, I.M.; Evans, S.; Hughes, F.M. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *J. Exp. Boil.* **2004**, *207*, 3369–3380. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Sokolova, I.M. Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *J. Exp. Boil.* **2004**, *207*, 2639–2648. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Achard-Joris, M.; Gonzalez, P.; Marie, V.; Baudrimont, M.; Bourdineaud, J.-P. Cytochrome c Oxydase Subunit I Gene is Up-regulated by Cadmium in Freshwater and Marine Bivalves. *BioMetals* **2006**, *19*, 237–244. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
82. Navarro, A.; Faria, M.; Barata, C.; Piña, B. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ. Pollut.* **2011**, *159*, 100–107. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
83. Dautremepuits, C.; Betoulle, S.; Paris-Palacios, S.; Vernet, G. Immunology-Related Perturbations Induced by Copper and Chitosan in Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *47*, 370–378. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
84. Dautremepuits, C.; Betoulle, S.; Paris-Palacios, S.; Vernet, G. Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Aquat. Toxicol.* **2004**, *68*, 325–338. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Jolly, S.; Jaffal, A.; Delahaut, L.; Palluel, O.; Porcher, J.-M.; Geffard, A.; Sanchez, W.; Betoulle, S. Effects of aluminium and bacterial lipopolysaccharide on oxidative stress and immune parameters in roach, *Rutilus rutilus* L. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, *21*, 13103–13117. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

86. Le Guernic, A.; Sanchez, W.; Palluel, O.; Bado-Nilles, A.; Floriani, M.; Turies, C.; Chadili, E.; Della Vedova, C.; Cavalié, I.; Adam-Guillermin, C.; et al. Acclimation capacity of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure. *Ecotoxicology* **2016**, *25*, 1478–1499. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
87. Petitjean, Q. Response variability to multiple stressors exposure in wild gudgeons (*Gobio occitaniae*). Ph.D. Thesis, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France, 2019. [[Google Scholar](#)]
88. Ciliberti, A.; Chaumot, A.; Recoura-Massaquant, R.; Chandesris, A.; François, A.; Coquery, M.; Ferréol, M.; Geffard, O. Caged Gammarus as biomonitors identifying thresholds of toxic metal bioavailability that affect gammarid densities at the French national scale. *Water Res.* **2017**, *118*, 131–140. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Gouveia, D.; Chaumot, A.; Charnot, A.; Almunia, C.; François, A.; Navarro, L.; Armengaud, J.; Salvador, A.; Geffard, O. Ecotoxic-Proteomics for Aquatic Environmental Monitoring: First in Situ Application of a New Proteomics-Based Multibiomarker Assay Using Caged Amphipods. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 13417–13426. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
90. McDonagh, B.; Tyther, R.; Sheehan, D. Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* **2005**, *73*, 315–326. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

Etude du protéome de stress chez des bivalves sentinelles ; recherche de nouveaux marqueurs pour la surveillance environnementale

Résumé

Les organismes aquatiques sont capables de répondre de manière adaptative aux effets toxiques des contaminants chimiques présents dans l'eau. L'étude qualitative de ces réponses est encore plus cruciale dans un contexte de changements climatiques. La recherche de biomarqueurs en écotoxicologie constitue une clé pour développer des outils pour la surveillance environnementale. Dans ce contexte, la protéomique sur des espèces sentinelles bivalves, telles que les moules marines du genre *Mytilus* et les moules dulcicoles du genre *Dreissena*, est une approche ouverte qui amène des connaissances nouvelles sur les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu dans les réponses au stress. Une exploitation bioinformatique de données de protéomique déjà acquises a été réalisée en utilisant les résultats issus d'une série d'expériences de stress chimiques et/ou thermiques. La stratégie a été de recycler et croiser les données acquises afin de recenser les protéines impliquées de façon récurrente. Ce travail a été complété par une analyse bibliographique qui a amené une sélection de candidats. De façon attendue, ont été mis en avant i. l'implication des protéines chaperonnes intervenant dans le recyclage, le repliement et le maintien des conformations des protéines, ii. des acteurs associés à la dynamique du cytosquelette, iii. des enzymes impliquées dans le maintien de la production d'ATP et enfin, iv. des molécules participant à l'équilibre redox de la cellule. Ces travaux ont mis en évidence des candidats avec un fort potentiel biomarqueur, parmi lesquels : la protéine 14-3-3-ε, la Heat Shock Protein 40, la Major Vault Protein et la phosphoenolpyruvate carboxykinase. De plus, des protéoformes partielles ont été révélées ; leur importance comme marqueur de stress a été discutée. Ce travail représente une étape préalable au développement de nouveaux biomarqueurs. Les candidats proposés devront faire l'objet d'une étude plus approfondie.

Mots-clés : méta-analyse ; homéostasie protéique ; adaptations ; dommages ; *Mytilus* ; *Dreissena*

Abstract

Aquatic organisms are able to adapt to the toxic effects of chemical contaminants in the water. The qualitative study of these responses is even more crucial in a climate change context. The search for biomarkers in ecotoxicology is key to developing tools for environmental monitoring. In this context, proteomics on sentinel bivalve species, such as marine mussels (genus: *Mytilus*) and freshwater mussels (genus: *Dreissena*), represent an open approach providing new knowledge on the molecular and cellular mechanisms involved in stress responses. A bioinformatic exploitation of previously acquired proteomic data was performed using results from a series of chemical and/or thermal stress experiments. The strategy was to recombine and cross-reference the acquired data in order to identify recurrent proteins. This work was completed by a literature review which led to a selection of candidates. As expected, *i.* chaperone proteins involved in the recycling, folding and maintenance of protein conformations, *ii.* cytoskeleton dynamics facilitators, *iii.* enzymes involved in the maintenance of ATP production and finally, *iv.* proteins involved in the cell redox balance were in the forefront. This work has highlighted candidates with a strong biomarker potential, *e.g.*: 14-3-3-ε Protein, Heat Shock Protein 40, Major Vault Protein and Phosphoenolpyruvate carboxykinase. In addition, partial proteoforms were revealed; their importance as stress markers was discussed. This work represents a preliminary step for developing new biomarkers, therefore, the proposed candidates will need further study before field application.

Keywords: meta-analysis; protein homeostasis; tolerance; damage; *Mytilus*; *Dreissena*