

# TOXICOLOGIE DÉVELOPPEMENTALE SUR LES LARVES DE MOULES : APPORT DES MÉTHODES D'IMMUNO- HISTOCHIMIE, D'HYBRIDATION *IN SITU* ET D'IMAGERIE POUR L'ÉTUDE FINE DES TISSUS

DUMOLLARD Rémi et MIGLIOLI Angélica

*Laboratoire de Biologie du Développement de Villefranche-sur-Mer (LBDV),  
Institut de la Mer de Villefranche, (IMEV), Sorbonne Université  
CNRS UMR 7009, 181, Chemin du Lazaret, 06230 Villefranche-sur-Mer, France*

remi.dumollard@imev-mer.fr

# DEVELOPMENTAL TOXICOLOGY ON MUSSEL LARVAE: CONTRIBUTION OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY, *IN SITU* HYBRIDIZATION AND IMAGING FOR THE DETAILED STUDY OF TISSUES

## ABSTRACT

Larval development of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* is a well-established model to assess the effects of environmental stressors on marine invertebrates. However, the scarce understanding of the processes regulating larval development in bivalve mollusks prevents the comprehension of their modes of action in these organisms. Accordingly, we devised live staining, whole mount *in situ* hybridization (WMISH) and immunostaining protocols to investigate in detail shell biogenesis and neurogenesis. These two major morphogenetic processes characterize *M. galloprovincialis* larval ontogeny and are extremely susceptible to both environmental contaminants and global change. Larval shell biogenesis was studied at close times post fertilization (pf) starting by the early trochophore stage (24 hours pf) until the D-Veliger stage (48 hours pf) with the two live dyes Calcofluor and Calcein which, respectively, stain the organic and calcified portion of the growing shell. During the same developmental window, early neurogenesis was studied with antibodies against the neurotransmitters serotonin (5-HT) and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). In addition, WMISH was performed to study the onset of dopaminergic (DOPA) neurons and the global neuronal population. Our results show that shell biogenesis starts at the trochophore stage with the secretion of a saddle-shaped organic matrix providing the scaffold for the following mineral deposition. At this same stage, mussel larvae already present a copious neuronal population which include both 5-HT and GABA positive cells, while DOPA neurons only appear at later stages. In D-Veligers, the shell is D-shaped with the organic and inorganic layers growing at the same rate while neurons, especially 5-HT, are organized in proto-ganglions. These techniques and findings allowed us to demonstrate neurotoxic as well as direct effects on the early stages of shell biogenesis for diverse stressors including Endocrine Disruptors.

## KEY WORDS

**mollusks, bivalves, larval shell morphogenesis, neurogenesis, endocrine disruptors, *in situ* hybridization**

## RESUME

Le développement larvaire de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* est un modèle bien établi pour évaluer les effets des facteurs de stress environnementaux sur les invertébrés marins. Cependant, les processus régulant le développement larvaire chez les mollusques bivalves sont encore très peu connus. Nous avons conçu des protocoles d'hybridation *in situ* (HIS), d'immuno-marquage et de colorations vitales pour étudier la biogénèse de la coquille et la neurogénèse, processus morphogénétiques extrêmement sensibles aux contaminants environnementaux et au changement climatique. La biogénèse de la coquille larvaire qui commence au stade trochophore précoce (24 heures post fécondation (hpf)) jusqu'au stade D-véligère (48 heures pf) est quantifiée par marquage avec les deux colorants vitaux Calcofluor et Calcéine qui, respectivement, colorent la matrice organique et la partie minérale de la coquille en croissance. Au cours de la même fenêtre de développement, la neurogénèse précoce a été étudiée avec des anticorps dirigés contre les neurotransmetteurs sérotonine (5-HT) et acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA). En outre, des HIS ont été réalisées pour étudier l'apparition des neurones dopaminergiques (DOPA) et la population neuronale globale. Nos résultats montrent que la biogénèse de la coquille commence dès le stade trochophore et qu'à ce stade larvaire les moules présentent déjà une population neuronale qui comprend à la fois des cellules 5-HT et GABA positives, tandis que les neurones DOPA n'apparaissent qu'au stade pré-véligère. Chez les D-véligères, la coquille est en forme de D tandis que les neurones, en particulier 5-HT, sont organisés en proto-ganglions. Ces techniques et découvertes nous ont permis de démontrer des effets neurotoxiques ainsi que des effets directs sur la biogénèse de la coquille par des perturbateurs endocriniens connus.

## MOTS CLÉS

**Mollusques, moule, morphogénèse de la coquille larvaire, neurogénèse, perturbateur endocrinien, hybridation *in situ***

## INTRODUCTION

Les mollusques constituent une partie importante des invertébrés marins. Parmi les mollusques, les bivalves comme la moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*) sont étudiés depuis des décennies en raison de leur importance écologique et commerciale [1]. Le cycle de vie de *M. galloprovincialis* est analogue à tous les autres mollusques bivalves et est caractérisé par la succession d'une phase planctonique suivie d'une phase benthique [2, 3]. Le développement embryonnaire des bivalves comprend les stades typiques des métazoaires spiraliens avec des transitions progressives entre les stades morula, blastula et gastrula [2]. Le stade gastrula signe la fin de la phase planctonique embryonnaire et le passage à la phase planctonique larvaire nageant librement. La première forme larvaire nageant librement est appelée trochophore. Au cours de cette étape, la larve commence à former la coquille larvaire ainsi que la neurogénèse et la morphogénèse de l'épithélium cilié servant à nager librement [3, 4].

La biogenèse de la coquille commence par la sécrétion de la matrice organique opérée par un groupe de cellules ectodermiques qui prennent le nom de « shell field » (champ de coquille) (**Figure 1**) [5, 6]. Les cellules composant le tissu du champ de coquille sont déjà présentes à la gastrulation, au cours de laquelle elles subissent une invagination complexe accompagnée d'un épaissement cellulaire (**Figure 1A gastrula**) [10]. L'épaississement des cellules du « shell field » conduit à une évagination progressive apparente du champ de coquille lorsque les embryons atteignent le stade trochophore et est suivie du début de la sécrétion de la matrice organique (**Figure 1A Trochophore**) [5]. Au début du développement, la coquille exclusivement organique prend la forme d'une selle de cheval et l'ensemble du complexe coquille- champ de coquille est nommé « shell field » en forme de selle de cheval (**Figure 2**) [11]. La matrice organique est principalement composée de chitine et de polysaccharides acides, de protéines et de glycoprotéines, qui jouent un rôle essentiel dans différents aspects de la formation de la coquille, tels que la nucléation de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ), la croissance et le choix des polymorphes de  $\text{CaCO}_3$  [12]. La couche inorganique commence bientôt à se déposer sur la matrice organique qui fournit un échafaudage pour le dépôt minéral (**Figure 1A**) [13]. Les deux composants commencent à se développer ensemble durant le développement larvaire sous la forme de deux valves symétriques qui recouvrent et enferment progressivement l'ensemble du corps larvaire dans une coquille en forme de D lorsque le stade D-véligère est atteint [13]. À ce stade, le « shell field » se différencie en manteau, le tissu formant la coquille chez les

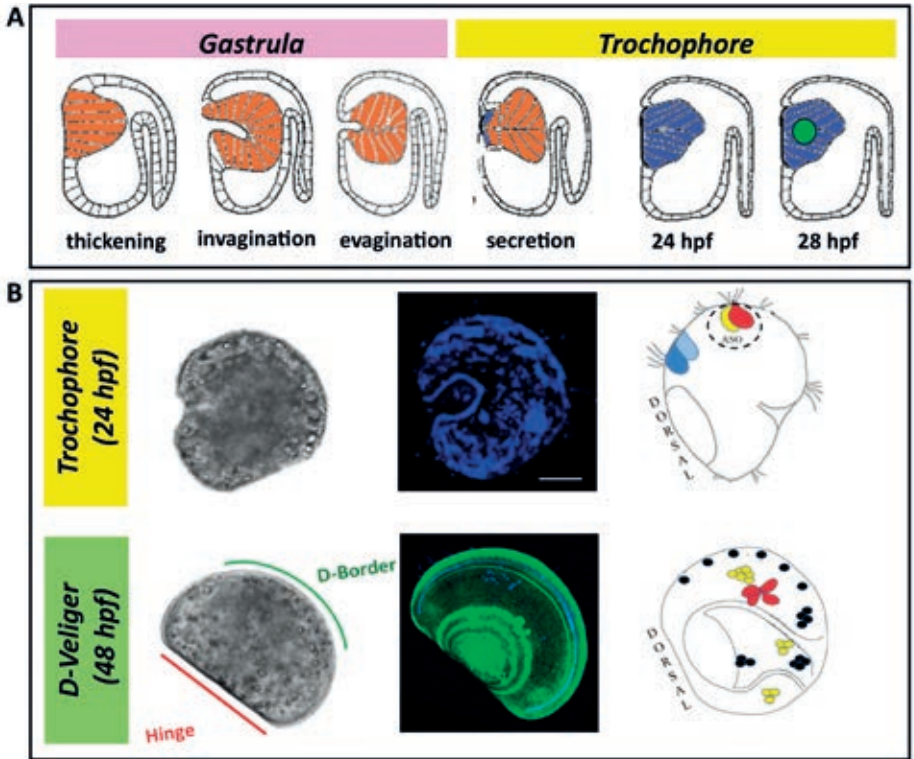


Figure 1 : Le développement larvaire précoce de *Mytilus galloprovincialis* (adapté de (8))

A) Formation du champ de coquille pendant le développement embryonnaire de *Mytilus*: représentations schématiques d'embryons de *Mytilus* aux stades gastrula et trochophore. La gastrula présente un épaissement de l'ectoderme dorsal au niveau du champ de coquille (en orange) suivi d'une invagination et d'une évagination. Au stade trochophore, la sécrétion de la matrice organique (bleu) commence à 24 hpf et la minéralisation (vert) à 28 hpf.

B) Coquille larvaire et développement neural chez *Mytilus*: colonne de gauche: images de trochophores et de larves D-véligères avec la face dorsale à gauche qui devient la charnière ("hinge") du stade D-véligère. La face ventrale de l'embryon devient la bordure D de la D-véligère ("D-border"). Colonne du milieu: embryons colorés au calcofluor (en bleu) et à la calcéïne (vert) montrant le "shell field" dorsal au stade trochophore et la coquille entièrement calcifiée au stade D-véligère. Barre d'échelle: 20 µm. Colonne de droite : représentation schématique des populations de cellules neuronales chez *Mytilus* dans des larves au stade trochophore et D-véligère. Le bleu indique les neurones périphériques sensoriels, les neurones sérotoninergiques sont marqués en rouge, le jaune indique les neurones FRM Famidergiques et les cellules contenant des catécholamines sont représentées en noir. La région de l'organe sensoriel apical (ASO) est indiquée par un cercle pointillé.

adultes [11]. La forme nette et caractéristique de la coquille des D-véligères est très sensible au stress venant de facteurs exogènes (comme l'acidification des océans, les polluants émergents, etc) qui se reflétera notamment par des malformations au niveau de la coquille [20, 21, 23]. De telles caractéristiques permettent d'employer efficacement les larves de *Mytilus* pour des tests standards d'embryotoxicité [14, 22].

En revanche, on sait peu de choses sur la neurogénèse larvaire de *M. galloprovincialis* jusqu'à présent. La neurogénèse des larves de mollusques a été étudiée et décrite chez d'autres mollusques bivalves tels que l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas* et la moule *Mytilus trossulus* [15, 16]. Le consensus est que les premiers neurones à apparaître dans la larve sont des cellules sensorielles, responsables de la conversion des stimuli externes de l'environnement [15]. Chez *C. gigas*, les premiers neurones périphériques apparaissent sur les faces dorsale et ventrale des larves trochophores, suivis de la formation de l'organe sensoriel apical larvaire (ASO) [15]. L'ASO est un organe sensoriel typique du stade trochophore localisé dans la région de la touffe apicale (**Figure 1B**).

Au début du développement de la trochophore, les premiers neurotransmetteurs à apparaître sont la sérotonine (5-HT) et le FRMFamide (H-Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>) un neuropeptide présent chez les mollusques, la sérotonine étant exclusivement localisée dans l'ASO et le FRMFamide dans l'ASO et les neurones périphériques [15]. À partir du stade véligère, on trouve également des cellules contenant des catécholamines. Les catécholamines sont un groupe de neurotransmetteurs et de neurohormones qui comprend la dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline. Les cellules contenant des catécholamines commencent à être détectées au stade pré-véligère et se localisent principalement dans le velum en extrusion et plus tard dans la bordure D de la coquille D-véligère ainsi que dans un petit groupe de cellules situé du côté dorsal de la larve (**Figure 1B**) [15, 16]. De manière intéressante, les premiers neurones et leurs neurotransmetteurs ont été liés à une série de fonctions régulatrices au cours du développement larvaire, notamment la locomotion, la structuration du système nerveux lui-même ainsi que la fixation et la métamorphose larvaires à des stades ultérieurs [15, 16]. De plus, l'action de la sérotonine et de la dopamine a récemment été liée au processus de biogenèse de la coquille larvaire chez *C. gigas* [17, 18]. Les mécanismes impliqués sont totalement inconnus en raison d'une mauvaise connaissance des processus de développement mis en jeu lors de la biogenèse de la coquille larvaire et de la neurogénèse chez ces invertébrés marins.

Les larves d'invertébrés marins et les premiers stades de leur vie ont longtemps été utilisés comme modèles expérimentaux dans diverses disciplines et non exclusivement liés à des problèmes environnementaux [7, 9]. De nos jours, le développement larvaire d'un certain nombre d'invertébrés marins de phylums distincts est également exploité lors de tests d'embryotoxicité standards conçus par l'Organisation internationale de normalisation - ISO ([www.iso.org](http://www.iso.org)) et ASTM international ([www.astm.org](http://www.astm.org)).

La pollution des eaux marines par des produits chimiques fabriqués par l'homme constitue un grave risque pour la santé des trois milliards de personnes vivant dans les zones côtières (8). De plus, cette pollution représente un grave danger pour les écosystèmes marins. Les animaux filtreurs, par exemple, accumulent des produits chimiques toxiques dans leur corps, mais ce sont les larves planctoniques qui sont les plus sensibles à la pollution et à tout type de stress au cours de leur développement [2]. En effet, de faibles concentrations de polluants peuvent avoir des impacts majeurs sur le développement et la survie des larves [2]. Le développement larvaire des mollusques est donc un modèle de choix pour étudier les impacts délétères de la pollution marine sur la biodiversité marine.

Dans ce contexte, notre étude vise à décrire les techniques et protocoles histologiques utilisés pour visualiser le développement de la coquille et le développement neural de *Mytilus*. Nous pensons que ces outils seront essentiels à la compréhension et à la caractérisation de paramètres (i.e. « endpoints ») distincts et spécifiques de toxicité développementale chez les mollusques bivalves, en utilisant la larve précoce de *Mytilus galloprovincialis* comme modèle.

## MATERIELS ET METHODES

### Moules, collecte de gamètes et fécondation

Toutes les procédures ont été effectuées comme décrit précédemment [19, 20, 21]. Des spécimens sexuellement matures de *M. galloprovincialis* ont été collectés dans la population naturelle de la baie de Villefranche-sur-Mer (43.682°N, 7.319°E - France) pendant la saison de ponte de 2018 à 2020 (décembre-mars). Les animaux ont été maintenus à l'Institut de la Mer de Villefranche (IMEV) par le Centre de Ressources Biologiques Marines de l'institut (CRBM) dans des aquaria à flux continu contenant de l'eau de mer naturelle filtrée Millipore (MFSW) (pH 7,9–8,0, salinité 38 ppt, 15 °C). Les gamètes ont été obtenues par ponte induite par choc

thermique dans MFSW (le protocole complet de ponte peut être téléchargé à partir de : <https://lbdv.imev-mer.fr/wp-content/uploads/Spawning-Protocol-Mytilus-galloprovincialis.pdf>). La fécondation a été effectuée comme décrit précédemment et conformément aux protocoles standardisés d'embryotoxicité (<https://www.iso.org/ics/13.060.70/x/>). Le succès de la fécondation est identifié par observation microscopique de la présence du globule polaire, un globule se formant au pôle animal de l'œuf. Après 30 min, le succès de la fécondation (n. œufs fécondés/n. œufs au total x 100) est calculé (il est habituellement supérieur à 90 %). Des cultures larvaires ont été préparées en MFSW avec une concentration maximale de 200 embryons/mL [22].

## Cultures larvaires en présence de toxiques

Les œufs fécondés ont été exposés (30 minutes après la fécondation) au bisphénol A (BPA, Sigma-Aldrich, Lyon, France) et au TetraBromoBisphénol A (TBBPA, Sigma-Aldrich, Lyon, France) dans des plaques à 24 puits. Les solutions mères de BPA et de TBBPA (0,5 M dans du diméthylsulfoxyde/DMSO) ont été diluées dans de la MFSW à 100  $\mu$ M et diluées en série au dixième pour obtenir les concentrations souhaitées (100 nM, 1  $\mu$ M et 10  $\mu$ M) et préparées en solution 2x en MFSW et ensuite diluées 2 fois dans le milieu de culture. Des échantillons de contrôles sont faits en parallèle dans de la MFSW dans laquelle le véhicule à la concentration finale utilisée (0,01 % de DMSO) a été ajouté.

## Développement larvaire et biogenèse de la coquille

La biogenèse de la coquille a été suivie à différentes heures après la fécondation (hpf) entre le stade trochophore précoce (24 hpf) et le stade D-véligère (48 hpf), en évaluant la croissance des composants organiques et inorganiques de la coquille à l'aide de Calcofluor (Fluorescent Brightener 28, Sigma-Aldrich, Lyon, France) et de Calcéine (Sigma Aldrich, Lyon, France) colorants fluorescents (bleu (Ex/Em: 365/435 nm) et vert (Ex/Em: 495/515 nm) respectivement, comme décrit précédemment [19, 20, 23]. Pour cela, de la calcéine a été ajoutée au milieu de culture (concentration finale 1 mM dans 0,01% de diméthylsulfoxyde; DMSO) avant l'ajout d'œufs fécondés tandis que le Calcofluor blanc a été directement ajouté à la culture de larves vivantes 5 minutes avant chaque temps d'échantillonnage (concentration finale 0,02 mM dans 0,01 % DMSO). Les larves ont été lavées dans MFSW pour éliminer l'excès des deux colorants et fixées avec 4 % de paraformaldéhyde (PFA) dans MFSW avant l'imagerie confocale. Comme décrit précédemment, les images confocales composites ont été rendues en 3D et la surface (en  $\mu$ m<sup>2</sup>) d'une valve dans chaque larve colorée a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ [19, 20, 21, 23].



## Hybridation *in situ*

Les paires d'amorces pour l'HIS des gènes montrés sont rapportées dans les matériaux et méthodes et les matériaux supplémentaires des références 19, 20 et 21. Des paires d'amorces d'HIS ont été utilisées pour amplifier un fragment d'ADNc pour chaque gène. Les produits de PCR (environ 1,5 kilobase-kb) ont été clonés dans un vecteur pGEM-T easy (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Le plasmide recombinant sélectionné a été linéarisé (enzymes de restriction SpeI et NcoI, New England BioLabs, Evry, France) et séquencé pour vérifier l'orientation de l'insert. Des sondes d'ARN sens et antisens marquées à la digoxigénine ont été synthétisées en utilisant le mélange de marquage d'ARN DIG (Roche, Meylan, France) et l'ARN polymérase T7/Sp6 (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Les sondes ont été testées sur des larves provenant d'au moins trois paires parentales indépendantes pour un total de 150 individus (N = 50 pour chaque paire parentale) imagés par point de temps. Le protocole d'HIS complet que nous avons conçu peut être téléchargé à partir de <https://lbdv.imev-mer.fr/wp-content/uploads/Mytilus-ISH-protocol.pdf>.

### A) Préparation et fixation des échantillons

Les larves au stade de développement souhaité sont récupérées dans un récipient de culture à l'aide d'un filtre à mailles de 40 µm ; puis les larves sont recueillies délicatement avec une pipette en plastique de 1 mL et transférées dans un tube de collecte de 1,5 mL contenant 50 µL de paraformaldéhyde (PFA) à 4 % dans du tampon Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X/eau de mer artificielle (EMA) ; le tube (pour les stades trochophores) est centrifugé ou on attend que les larves se culottent au fond du tube (pour les stades véligères). Le surnageant est ensuite ôté et on ajoute 1 mL de PFA 4 % dans du PBS1X/EMA. La fixation se fait pendant une nuit à 4°C ou pendant 1h à température ambiante ; on ôte l'excédent de fixateur avec 3 lavages en PBS-Tween (0,1 %) ; le surnageant est retiré, seules les larves doivent rester dans le tube ; les larves sont alors transférées dans un nouveau tube de prélèvement de 1,5 mL préalablement rempli de méthanol à 100 %. Une fois que les larves ont sédimenté, le surnageant est retiré et remplacé par du méthanol à 100 %. Les larves sont ainsi conservées à -20°C.

### B) Réhydratation et Hybridation

Les larves sont réhydratées en série avec du PBS1X/EMA 25 %, puis 50 %, puis 75 % et enfin 100 % ; après un lavage supplémentaire dans du PBS-Tween (0,1 %), les larves sont incubées pendant 25 minutes à 27°C (trochophores) ou à 37°C

(végigères) dans la protéinase K (10 µg/ml) diluée dans du PBS1X. La protéinase K est retirée à l'aide de deux lavages dans du PBS1X. Afin de rendre les larves trochophores plus transparentes, elles sont lavées dans une solution de glycine 0,1 M dans du PBS1X pendant 5 minutes puis lavées deux fois avec du PBS-Tween (0,1 %). Les larves sont fixées à l'aide d'une solution de PFA 4 % en PBS1X pendant 40 minutes à température ambiante. Le fixateur est retiré par trois lavages avec du PBS-Tween (0,1 %). Le surnageant est retiré et les larves sont transférées dans un nouveau tube de collecte de 1,5 mL préalablement rempli de tampon d'hybridation ; les tubes sont laissés à température ambiante pendant 15 minutes ; les larves sont réparties dans la plaque multi-puits et pré-hybridées à 65 °C pendant au moins 2 heures. Les sondes (diluées dans le tampon d'hybridation) sont ajoutées et on laisse le tout s'hybrider à 65 °C pendant au moins 18 heures.

### C) Lavage des sondes et incubation avec des anticorps anti-digoxigénine (DIG)

Les sondes sont retirées avec le tampon d'hybridation et conservées dans un nouveau tube (les sondes peuvent être utilisées jusqu'à 3 fois) ; puis les séquences se suivent ainsi :

A 65°C : Laver les larves avec 2 lavages de 30 minutes dans la Solution 1 ;

A 65°C : Laver les larves pendant 30 minutes avec la Solution 2 ;

A 65°C : Laver les larves pendant 30 minutes avec la Solution 3 ;

A 65°C : Laver les larves pendant 30 minutes avec la Solution 4 ;

Enfin, laver les larves dans du PBS-Tween (0,1 %) si ce sont des trochophores ou dans du PBS Triton X-100 (1%) si ce sont des végigères à température ambiante ;

Incuber les larves avec le tampon de blocage pendant 1 heure à température ambiante, avant d'incuber les larves avec l'anticorps anti-DIG (1:4000 dans le tampon de blocage) pendant une nuit à 4°C.

L'excès d'anticorps est éliminé avec 5 lavages d'une heure dans du Tris Buffer Saline (TBS)-Tween (0,1 %). Puis les larves sont laissées dans du TBS-Tween (0,1 %) pendant une nuit à 4 °C.

#### **Composition des réactifs utilisés :**

**Tampon d'hybridation :** 50% Formamide (25 mL), 6X Sel de Sodium Citrate (SSC) (15 mL de solution 20X), 5X Denhardt (2,5 mL de solution de Denhardt à 100X), 1 mg/mL d'ARN/tARN de levure (2,5 mL de solution à 20 mg/mL), 0.1% Tween 20 (500 µL, Tween 10%) ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC (DiEthylPyroCarbonate).

**Solution 1 :** Solution 50% Formamide (25 mL), 5XSSC (12,5 mL de solution 20X), 1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (2,5 mL de solution à 20%) ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC.

**Solution 2 :** 50% Formamide (25 mL), 2XSSC (5 mL de solution 20X), 1%SDS (5 mL de solution à 10%) ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC.

**Solution 3 :** 2XSSC (5 mL de solution 20X), 0,1% Tween 20 (500 µL, Tween 10%) ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC.

**Solution 4 :** 0,2XSSC (0,5 mL de solution 20X), 0,1% Tween 20 (250 µL, Tween 10%) ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC.

**Tampon de blocage pour les trochophores :** 0,1M Tris (5 mL de solution à 1M; pH 7,5); 0,15M NaCl (1,5 mL de solution à 5M); 1% BBR (5 mL de solution Boehringer Blocking Reagent (BBR) à 10%), 0,1% Tween 20 (500 µL, Tween 10%), ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC.

**Tampon de blocage pour les véligères :** 0,1M Tris (5 mL de solution à 1M; pH 7,5); 0,15M NaCl (1,5 mL de solution à 5M); 0,5% BBR (2,5 mL de solution BBR à 10%), 1% Triton-X (500 µL), ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC.

#### D) Révélation avec NBT/BCIP (Nitro Blue Tetrazolium/ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate)

Laver une dernière fois les larves dans du TBS-Tween (0,1 %) avant de les incubé dans le tampon de révélation NBT/BCIP pendant 10 minutes à température ambiante. Préparer une solution avec le NBT et le BCIP dans leur tampon et l'ajouter aux larves (pour 1 mL de tampon de révélation : 3,5 µL de solution de BCIP à 50 mg/mL, 6,75 µL de solution NBT à 50 µg/mL). Laisser le signal se révéler à une température constante (16-25°C, plus la température est basse, plus le risque d'obtenir un signal non spécifique sur les bords de la coquille est faible), remettre en suspension la solution toutes les 30 minutes ou placer les larves sur un agitateur et protéger de la lumière. Renouveler la solution de NBT/BCIP toutes les 3 heures dans le cas des véligères ; pour finir, bloquer la réaction avec 3 lavages de 5 minutes dans du TBS-Tween (0,1 %) et de l'acide Ethylene Diamine TetraAcétique (EDTA) à 50 mM. Effectuez 5 ou 6 autres lavages dans du TBS-Tween (0,1 %) et laissez une nuit dans du PBS-Tween (0,1 %) à +4°C. Des lavages supplémentaires et un temps d'incubation dans du PBS-Tween aideront à obtenir une bonne qualité de signal en rendant les larves plus transparentes et la coloration plus évidente ; ensuite faire tremper les larves dans du glycérol à 80 % dans du PBS 1X et les laisser une

nuit à 4°C. Le lendemain, laissez les larves pendant 10/20 minutes à température ambiante avant de les monter sur lame et de procéder à l'imagerie.

**Composition des solutions utilisées : Tampon de révélation NBT/BCIP :**  
0,1M Tris (5 mL de solution Tris à 1M, pH 9,5), 50 mM MgCl<sub>2</sub> (2,5 mL de solution MgCl<sub>2</sub> à 1M), 100 mM NaCl (1 mL de solution NaCl à 5M), 0.1% Tween 20 (500 µL, Tween 10%), ajustée à 50 mL avec de l'eau DEPC.

## Immunohistochimie

Des anticorps dirigés contre le neurotransmetteur sérotonine (5-HT, Cat #20080, Immunostar, Hudson, WI, USA) et l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA, A2052, Sigma Aldrich) ont été utilisés pour visualiser le développement des systèmes sérotoninergique et GABAergique chez les larves de *Mytilus* à différents moments cf, comme décrit précédemment [20, 21], en utilisant une adaptation des protocoles déjà disponibles pour les larves d'autres bivalves [15, 16].

Les échantillons ont été incubés avec des anticorps primaires soit contre 5-HT (1:10000) ou GABA (1:4000) pendant 5 jours à +4°C. Par la suite, les échantillons ont été incubés avec l'anticorps secondaire anti-Rhodamine Red™-X (RRX) IgG (1:500, Ex/Em : 570/590 nm - Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) pendant 3 jours à 4°C. La liaison non spécifique a été évaluée dans des sous-échantillons incubés uniquement en présence de l'anticorps secondaire (non représenté) comme décrit précédemment [20]. Les larves ont ensuite été colorées avec 1 µg/mL de Hoechst (Ex/Em: 352/461 nm - Hoechst 33342, Invitrogen) dans du PBS et montées avec une solution tamponnée au phosphate de glycérol contenant un agent anti-fading (CitiFluor™ AF1, pH 10, Agar scientifique). Les échantillons ont été imagés avec un microscope Leica SP8 CLSM. Le signal Hoechst, l'immunoréactivité 5-HT et les signaux Brightfield ont été scannés séquentiellement avec un intervalle de pile Z de 0,3 µm. À l'aide du logiciel ImageJ, les canaux ont été fusionnés et les piles Z ultérieures ont été assemblées afin d'évaluer le nombre de cellules 5-HT-ir (immunoréactives) comme décrit dans la figure 5 et précédemment [20, 21]. Les larves colorées avec des anticorps GABA ont été entièrement imagées dans des piles Z de 0, 6 µm pour un total de 100 plans z, avec des projections Z réalisées avec 10 plans z séquentiels (de z10 à z100). Au moins 50 individus ont été analysés pour chaque échantillon et condition expérimentale (N = 5).

## RESULTATS

### Les différentes étapes de la morphogenèse de la coquille larvaire

La coquille larvaire est composée d'une couche ou matrice organique (en bleu sur les **Figure 1 et 2**) et d'une couche inorganique (ou coquille calcifiée en vert sur les **Figure 1 et 2**) qui est constituée par le dépôt de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ). Il est possible de suivre le dépôt progressif de la matrice organique de la coquille et du  $\text{CaCO}_3$  dans les embryons vivants de *Mytilus galloprovincialis* en utilisant le protocole de double coloration avec le calcofluor et la calcéine (**Figure 2A**, 19). Dès 24 hpf (quand la trochophore commence à sécréter la matrice organique) le signal calcofluor (bleu) est principalement visible dans une zone en forme de selle correspondant au champ de coquille (**Figure 2A**), qui à ce stade est encore partiellement invaginé. À ce moment, aucune coloration de calcéine n'est observée, indiquant l'absence de dépôt stable de  $\text{CaCO}_3$  (**Figure 2A**). À 28 hpf, la zone calcifiée (en vert sur la **Figure 2A**) occupe une grande partie de la coquille en croissance, et la matrice organique peut encore être observée le long des marges externes de la valve (**Figure 2A**). Cependant, aucune calcification n'est encore visible dans la région charnière qui, à ce moment, a terminé son aplatissement. À 32 hpf, l'organisation du corps change radicalement, la larve prenant la forme caractéristique en D du stade véligère (**Figure 2A**) : la valve est largement calcifiée, montrant les premiers anneaux d'accrétion indiquant le dépôt progressif de  $\text{CaCO}_3$ . La coquille calcifiée recouvre la matrice organique, à l'exception d'une fine couche le long des marges de la valve. À 48 hpf, le stade D-véligère est atteint, la coquille calcifiée recouvre maintenant tout le corps de la larve et montre des anneaux d'accrétion concentriques plus évidents (**Figure 2A**). En quantifiant les surfaces occupées par la matrice et la coquille calcifiée dans une seule valve de chaque larve, nous avons montré que les surfaces occupées par chaque composant de la coquille ont une croissance exponentielle similaire, les surfaces de la matrice organique étant significativement plus élevées que celles de la coquille calcifiée en tout temps après la fécondation [19].

### Patrons d'expression de gènes impliqués dans la synthèse de la matrice organique

Plusieurs gènes participant à la synthèse et au dépôt des protéines de la matrice de la coquille (SMP) chez les mollusques sont connus et ils peuvent également être utilisés pour surveiller la morphogenèse de la coquille larvaire dans des embryons de *Mytilus* grâce à la technique d'hybridation *in situ* (HIS). Nous présentons ici 3 de

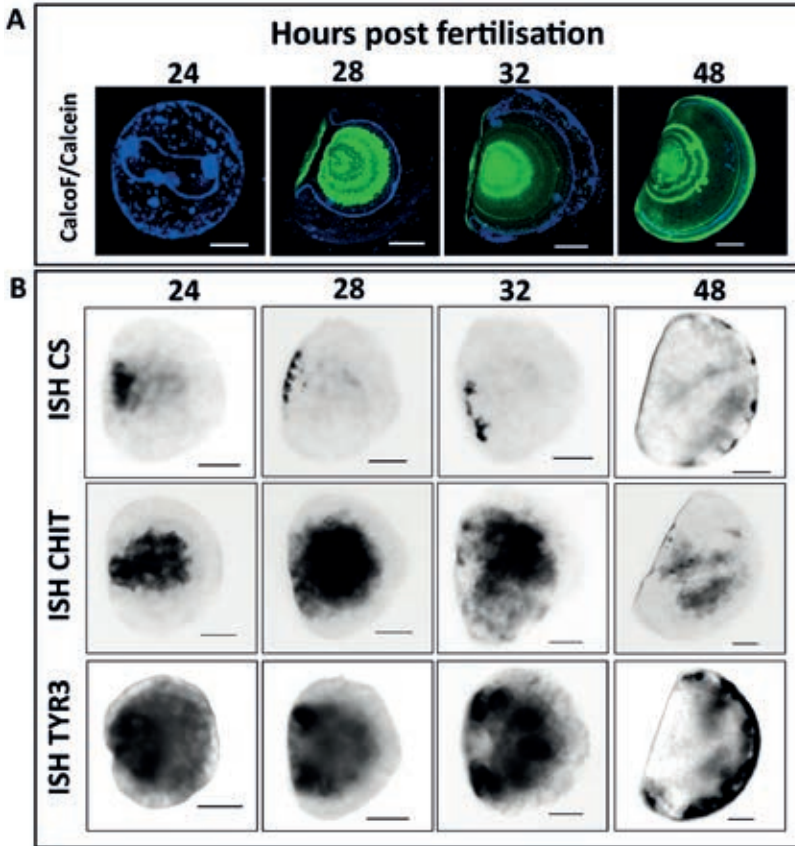


Figure 2 : Observation de la croissance de la coquille avec la double coloration Calcofluor/ Calcéine et l'expression génique par hybridation *in situ* (HIS) dans la même culture larvaire de *M. galloprovincialis*.

A) Images confocales montrant l'évolution dans le temps de la formation de la coquille de *M. galloprovincialis* du stade trochophore (24 hpf) au stade D-véligère (48 hpf). Le signal fluorescent du calcofluor (bleu) correspond à la matrice organique tandis que le signal de fluorescence de la calcéine (vert) correspond au dépôt de carbonate de calcium. La sécrétion de la matrice organique est visible à partir de 24 hpf (bleu). A 28 hpf, les valves calcifiées sont bien développées sur la matrice organique. À 32 hpf, la calcification atteint les marges externes de la matrice organique et s'étend vers la région charnière. A 48 hpf, toute la coquille est calcifiée et enferme complètement le corps larvaire. Barres d'échelle, 20  $\mu$ m.

B) Utilisation de l'hybridation *in situ* (HIS) de gènes de champ de coquille pour surveiller la morphogénèse de la coquille. Images des signaux HIS de la chitine synthase (CS), de la chitinase (CHIT) et de la tyrosinase (TYR) à 24, 28, 32 et 48 hpf. Barres d'échelle : 20  $\mu$ m.

ces gènes qui sont exprimés dans différentes parties de la coquille en croissance.

Les chitine synthases (CS) sont des glycosyltransférases transmembranaires responsables de la synthèse de la chitine, une protéine majeure de la matrice coquillière [24]. Les analyses en qPCR dans les embryons de *Mytilus* ont révélé que la CS a un taux basal d'ARNm élevé dans les œufs qui n'est pas augmenté avant 48 hpf [19]. L'analyse par HIS de ce gène révèle que, à 24 hpf, l'expression est faible et concentrée dans une petite zone à l'intérieur du champ de coquille (**Figure 2B**). Un signal similaire, mais plus fort, est détecté à 28 hpf, dans une zone proche de la région charnière. À 32 hpf, l'expression de la CS se propage le long de l'axe de la charnière alors qu'à 48 hpf, l'expression est plus forte dans la marge D de la D-véligère que dans la région de la charnière (**Figure 2B**).

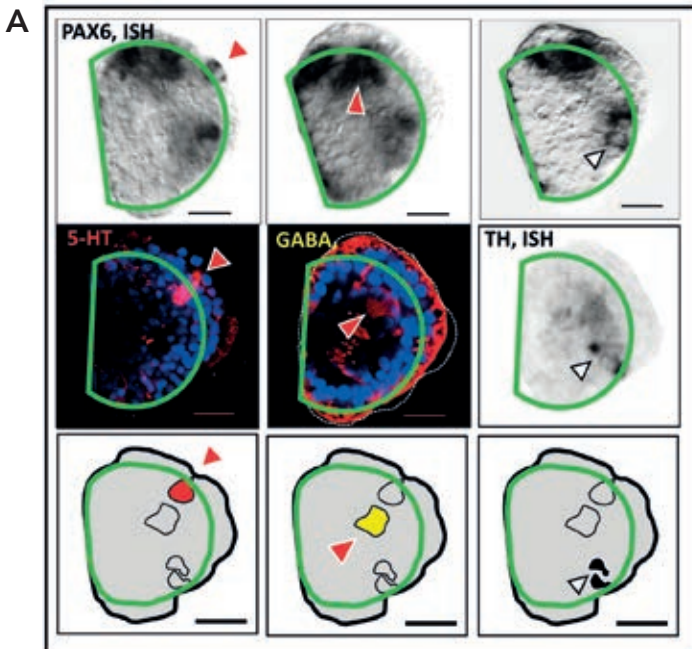
La chitinase (CHIT) est une enzyme de biominéralisation bien connue impliquée dans le métabolisme de la chitine. Le gène CHIT est exprimé dans les trochophores bivalves où il participe au développement de la coquille larvaire [18, 25]. Il est intéressant de constater que CHIT est régulé positivement au stade trochophore dans des larves de *Mytilus* exposées à de l'eau de mer acidifiée (pour imiter l'acidification des océans) [26]. L'analyse HIS montre que la Chi est exprimée dans une grande partie du champ de coquille de 24 à 32 hpf mais pas dans l'ensemble de celui-ci (**Figure 2B**). En revanche, il semble que la CHIT ne soit exprimée que dans les parties internes de la coquille déposée à 48 hpf (**Figure 2B**).

Les tyrosinases peuvent être impliquées dans la formation de la matrice de la coquille en réticulant des protéines fibreuses riches en quinones réactives pour former des polymères insolubles dans l'eau et résistants aux protéases. On pense que des tyrosinases participent à la phase initiale de formation de la coquille chez les huîtres [27, 28] ainsi qu'aux premières larves de moules [19, 29]. L'analyse qPCR a révélé qu'un des gènes codant pour une tyrosinase (TYR3) montre une faible expression dans les œufs fécondés et est fortement augmentée dans les trochophores de *M. galloprovincialis* [19]. L'analyse HIS montre que TYR3 est détectable à 24 hpf dans une large zone du champ de la coquille (**Figure 2B**). À 28 hpf, le signal TYR3 chevauche la coquille en croissance avec une expression plus forte sur les marges du champ de la coquille (**Figure 2B**). À 32 hpf, l'expression de TYR3 est concentrée dans des taches arrondies le long de la marge de croissance de la coquille et absente au centre des zones calcifiées. Au premier stade D-véligère complètement développé, à 48 hpf, l'expression est limitée aux marges de la valve en croissance et aucun signal n'est détectable dans la partie calcifiée de la coquille (**Figure 2B**). Ces analyses en HIS montrent clairement que la régulation à la hausse

du gène TYR3 précède et suit ensuite la croissance de la matrice organique dans la trochophore.

## Neurogénèse larvaire

La neurogénèse larvaire de *M. galloprovincialis* n'a été documentée que très récemment dans notre laboratoire. Deux techniques d'imagerie sont disponibles pour localiser les populations neuronales dans des larves en développement : la plus spatialement résolutive est l'immunohistochimie contre des neurotransmetteurs (lorsque des anticorps sont disponibles) et la plus exhaustive est l'HIS sur les gènes neuronaux (les gènes neuronaux sont soit des facteurs de transcription neurogéniques connus tels que Pax6, Ato1, Acs ou des gènes impliqués dans les fonctions neuronales). Les HIS de marqueurs neuronaux conservés tels que Pax6 sont très utiles pour localiser les différents domaines neuronaux dans la larve de *Mytilus* (**Figure 3A**). Cependant, ces types de gènes pan-neuronaux ne permettent pas de discriminer entre les différents neurones. Afin de discriminer les différentes populations neuronales, il faut utiliser l'immunohistochimie des neurotransmetteurs ou l'HIS de gènes exprimés uniquement dans un seul type de neurone comme les enzymes anaboliques et cataboliques de neurotransmetteurs spécifiques ou les transporteurs et récepteurs de ces neurotransmetteurs.





B

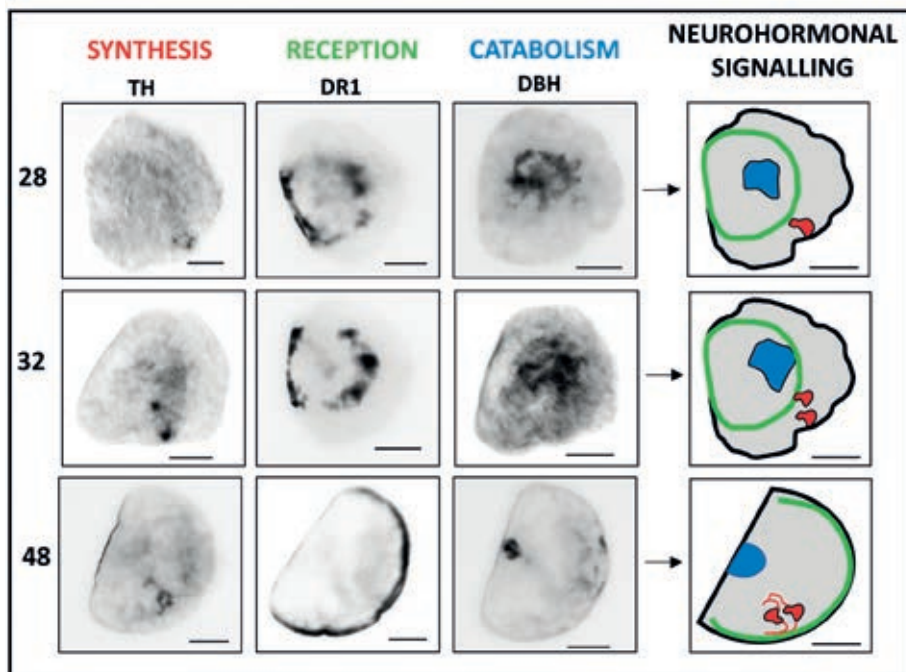


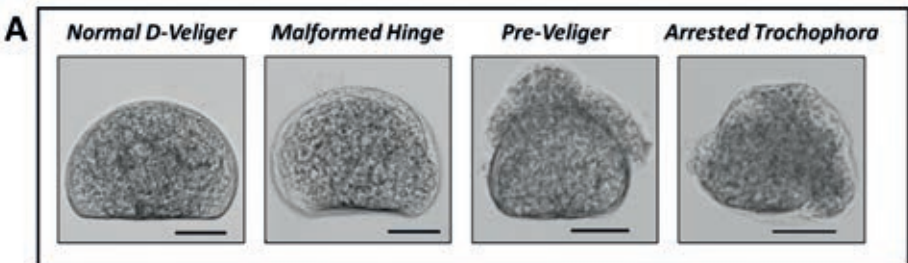
Figure 3 : Neurog nese chez la larve précoce de *M. galloprovincialis*.

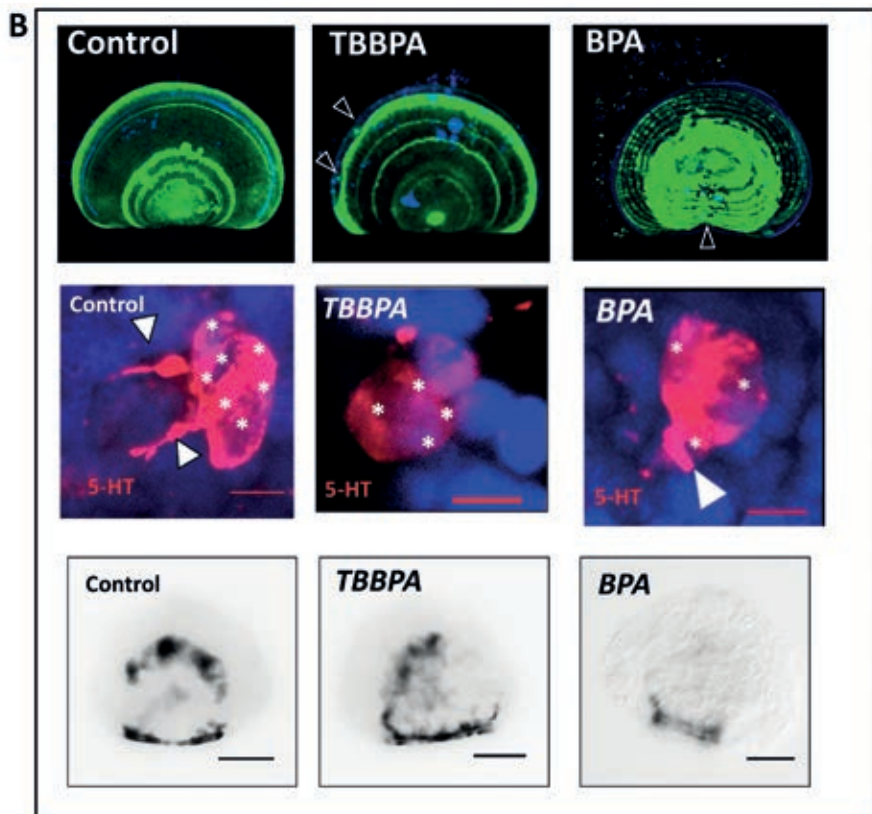
A) Trois populations neuronales dans des trochophores de 32 hpf : signal HIS de première rangée du gène marqueur pan-neuronal PAX6 montrant trois populations neuronales distinctes (têtes de flèches) observées dans une trochophore de 32 hpf. Rangée du milieu : les deux premières images montrent l'immunohistochimie pour 5-HT (cellules sérotoninergiques, tête de flèche) et GABA (cellules GABAergiques, tête de flèche) dans des trochophores à 32hpf. La troisième image montre une ISH pour le gène TH (Tyrosine Hydroxylase) un marqueur des cellules dopaminergiques (tête de flèche). Rangée du bas : représentations schématiques montrant les trois populations neuronales distinctes dans des trochophores à 32hpf avec les cellules sérotoninergiques en rouge, les cellules GABAergiques en jaune et les cellules dopaminergiques en noir. Le contour vert représente les limites du champ de la coquille. Barres d'échelle : 20  m.

B) Développement de la signalisation de la dopamine. Images HIS montrant les patrons d'expression des composants dopaminergiques au cours du développement larvaire (  28, 32 et 48 hpf). TH (Tyrosine Hydroxylase) indique la synthèse de la dopamine, DR1 (Dopamine Receptor 1) indique la réception de la dopamine et D H (Dopamine Beta Hydroxylase) indique le catabolisme de la dopamine. L'emplacement distinct de ces trois composants du métabolisme de la dopamine dans la larve suggère un rôle de la dopamine dans la signalisation neurohormonale au cours du développement de *Mytilus*. Barres d'échelle : 20  m.

Dans l'embryon de *Mytilus galloprovincialis*, les premiers neurones sérotoninergiques sont détectés dans l'ASO à partir de 24 hpf dans la trochophore (**Figure 1B**) [20]. Au cours du développement de la trochophore, le nombre de neurones sérotoninergiques augmente, mais ils restent localisés dans une seule structure semblable à un ganglion qui se situe près de la bordure D de la D-véligère (48 hpf, **Figure 3A**). Le marquage immunohistochimique de la sérotonine offre la possibilité de compter les cellules sérotoninergiques positives par microscopie confocale en utilisant la co-coloration des cellules sérotoninergiques et de tous les noyaux (par le Hoechst) dans le même individu (**Figure 4B, Figure 5**). Dans les larves de *M. galloprovincialis*, l'immunoréactivité de la sérotonine (5-HT) (ir) est détectable à partir de 24 hpf dans quelques cellules situées dans la zone pré-trochale de la larve, près des cils apicaux [20]. Au fur et à mesure que la larve se développe, le nombre de cellules 5-HT-ir passe progressivement à trois à 28 hpf, et à quatre dans la trochophore tardive (32 hpf) et jusqu'à 7 dans la D-véligère (48 hpf) [20] (**Figure 4B, Fig. 5**). Dans les D-véligères, les neurones positifs à la sérotonine sont organisés en une structure pyramidale compacte avec des axones/neurites visibles émergeant vers la charnière de la face dorsale de la larve (**Figure 4B**). En utilisant l'imagerie confocale des cellules 5HT-ir avec Hoechst, nous sommes en mesure de compter plus précisément le nombre de cellules 5HT-ir (**Figure 5**). En comptant le nombre de noyaux cellulaires colocalisés avec la coloration 5-HT, nous pouvons compter avec précision 7 cellules sérotoninergiques dans la D-véligère illustrée dans la **Figure 5** et trouver un nombre plus élevé de neurones sérotoninergiques dans les D-véligères à ce stade que dans d'autres espèces de bivalves [20].

L'apparition de cellules GABA-ir peut également être évaluée par immunohistochimie en utilisant des anticorps anti-GABA disponibles dans le commerce (**Figure 3A**). Dans les larves de *M. galloprovincialis*, plusieurs cellules GABA-ir sont détectées à 24 et 28 hpf, le long du champ de la coquille et au centre du corps [21]. A partir





**Figure 4 : Phénotypes induits par le stress chimique/environnemental des D-véligères de *M. galloprovincialis*.**

A : Images en champ clair d'embryons de *Mytilus* cultivés pendant 48 heures jusqu'aux stades D-véligères. Par analyse visuelle de la morphologie générale des larves, nous pouvons remarquer trois phénotypes différents de la D-véligère normale (Normal D-Veliger). Il s'agit de la charnière malformée (« Malformed Hinge »), de la pré-véligère (« Pre-Veliger ») et de la trochophore arrêtée (« Arrested Trochophora »). Barres d'échelle : 20 µm.

B : phénotypes larvaires induits par le BPA et le TBBPA : première rangée : phénotypes de coquille évalués par coloration avec CalcoF/Calcéine suivie d'une imagerie confocale 3D. Les pointes de flèches blanches indiquent la zone des morphologies affectées de la coquille. Barre d'échelle: 20 µm. Rangée du milieu : phénotype neural évalué en comptant le nombre de cellules 5-HT positives (voir la figure 5 pour la méthode de comptage des cellules). Chez la larve témoin on observe 7 cellules sérotoninergiques alors qu'il n'y a que 5 et 3 cellules chez les larves cultivées en présence de TBBPA et de BPA respectivement. Les pointes de flèches blanches indiquent la présence de neurites. Barres d'échelle : 10 µm. Rangée du bas : phénotype neuronal évalué par analyse HIS de l'expression du récepteur de la dopamine 1 (DR1) à 32 hpf. Barres d'échelle : 20 µm.

de 32 hpf, l'immunoréactivité se concentre le long des marges externes des larves. À 48 hpf, un groupe de cellules GABAergiques peut être observé dans un ganglion différent du ganglion sérotoninergique (**Figure 3A**). Les cellules GABAergiques se trouvent également dans d'autres parties des larves, même dans des régions non neuronales. Cela indique que cet anticorps pourrait également avoir une liaison non spécifique (**Figure 3A**).

Parce que nous n'avons pas pu trouver d'anticorps capables de colorer spécifiquement les catécholamines, nous avons cherché à localiser les neurones à catécholamines dans des larves de *Mytilus* en utilisant l'HIS contre des gènes spécifiques pour chaque type de catécholamines. Nous présentons ici des données relatives à la voie dopaminergique que nous avons pu localiser dans la larve.

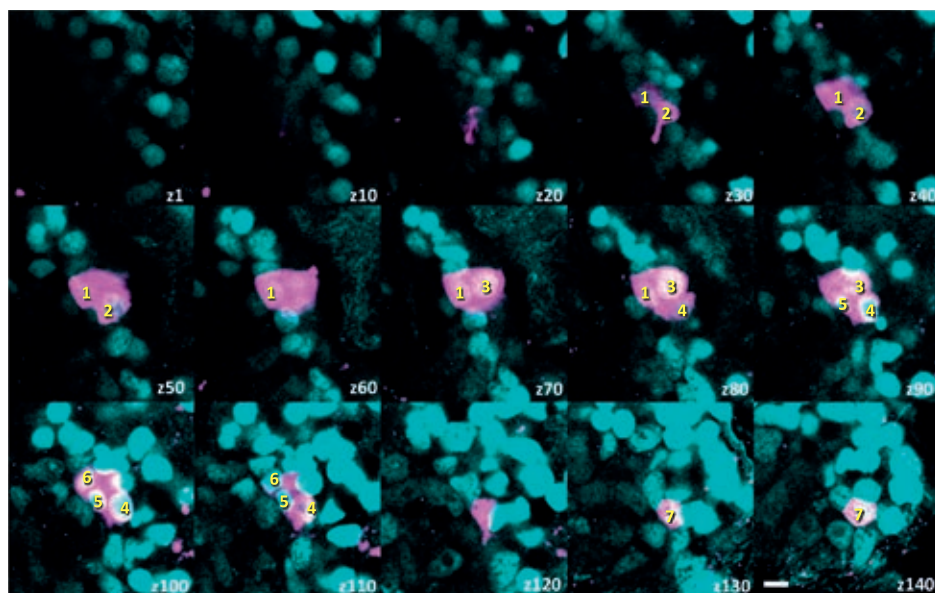
Pour localiser spécifiquement le système dopaminergique, nous avons analysé par HIS les profils d'expression des enzymes clés impliquées dans la synthèse de DOPA (Tyrosine Hydroxylase, TH) et le métabolisme (Dopamine- $\beta$ -Hydroxylase, D $\beta$ H) et du récepteur DOPA (DR1) (**Figure 3B**). Dans les larves de *Mytilus*, le marqueur dopaminergique TH montre une localisation diffuse à 24hpf, [21] suivie d'une concentration progressive dans deux clusters de neurones dopaminergiques à 28 hpf et 32 hpf alors qu'à 48 hpf, une localisation claire de TH dans un seul cluster est observée (**Figure 3B**). L'HIS du gène DR1 montre que ce récepteur de la dopamine est situé à la marge du champ de la coquille à 28 hpf et 32 hpf alors qu'il est exprimé dans la bordure D de la véligère à 48 hpf (**Figure 3B**). L'expression de l'enzyme catabolique dopaminergique D $\beta$ H est assez diffuse dans la partie centrale des trochophores à 28 et 32 hpf mais elle devient très localisée au milieu de la région charnière de la D-véligère (à 48 hpf, **Figure 3B**). L'emplacement dispersé de la synthèse (TH), de la réception (DR1) et de l'anabolisme (D $\beta$ H) de la dopamine dans les larves de *Mytilus* indique que la dopamine agirait comme une neurohormone dans cet organisme plutôt que comme un simple neurotransmetteur.

## Effet des polluants sur la coquille et le développement neuronal

La possibilité de cultiver en parallèle des centaines de milliers de larves de *Mytilus* qui atteignent le stade D-véligère en 48 heures permet de cribler l'effet des toxiques et de caractériser l'embryotoxicité (ou la tératogénicité) et la toxicité neurodéveloppementale des composés testés ou d'échantillons marins. Le protocole le plus simple consiste en une analyse de la morphologie des larves après 48 heures de culture. Une telle analyse de la morphologie larvaire peut être complétée par les protocoles de coloration décrits ci-dessus pour évaluer plus

spécifiquement l'altération de la morphogenèse de la coquille et du développement neuronal.

En utilisant les protocoles décrits dans les chapitres précédents, nous avons évalué l'impact de plusieurs perturbateurs endocriniens connus sur le développement de *M. galloprovincialis*. Les phénotypes (ou « endpoints ») notés lors du bio-essai larvaire sont des phénotypes très simples basés sur la morphologie des larves après 48 heures d'exposition au produit chimique testé [20, 21, 22]. À 48 hpf, les larves de *Mytilus galloprovincialis* devraient avoir une forme en D caractéristique en raison de



**Figure 5 : Comptage des neurones sérotoninergiques chez les D-véligères de *M. galloprovincialis* par immunohistochimie.**

Images confocales en série prises à 0,6  $\mu\text{m}$  d'intervalle d'un stade D-véligère (48 hpf) coloré pour la sérotonine (5-HT en magenta) et les noyaux avec du Hoechst (cyan). Les superpositions magenta et cyan ont été choisies pour mieux montrer la présence de noyaux dans l'image de superposition. Des images à 6  $\mu\text{m}$  d'intervalle sont affichées (avec la tranche z indiquée). Le comptage des cellules 5-HT positives se fait en marquant dans chaque image les noyaux entourés par la coloration 5-HT (numéro de cellule indiqué en jaune sur les images). Les noyaux cellulaires englobent plusieurs plans z (par exemple, le noyau de la cellule #1 est visible de z30 à z80 tandis que le noyau de la cellule #7 est visible de z130 à z140). Le ganglion sérotoninergique de cette D-véligère est composé de sept cellules. Barre d'échelle : 5  $\mu\text{m}$ .

la coquille calcifiée tandis que tout le corps de la larve est contenu dans la coquille (Figure 4A, « normal D-veliger »). Les principaux phénotypes morphologiques observés sont soit une charnière qui est plus droite (**Figure 4A**, « malformed hinge ») ou une véligère plus petite avec une forme en D encore apparente mais où le corps de la larve n'est plus contenu dans la coquille (« Pre-veliger » dans la **figure 4A**, également appelé « protruding mantle » dans de nombreuses études publiées). Le phénotype le plus radical est lorsqu'une forme en D ne peut plus être observée et que ces larves semblent arrêtées au stade trochophore (**Figure 4A**, « arrested trochophora »). Ces phénotypes morphologiques peuvent être facilement imagés et comptés par microscopie à lumière transmise qui permet d'imager les grands nombres de larves nécessaires pour des études toxicologiques et des criblages. En utilisant une telle analyse morphométrique, nous avons constaté qu'un pH acidifié (suivant un scénario d'acidification des océans) augmente la présence de larves avec une charnière affectée et avec un manteau saillant (phénotype pré-véligère) [23]. Les toxiques tels que le bisphénol A (BPA) (à des concentrations environnementales) induisent principalement des pré-véligères [20] tandis qu'une concentration environnementale de tétrabromobisphénol A (TBBPA) induit des pré-véligères et arrête les trochophores [21].

La coloration CalcoFluor/Calcéine peut révéler davantage de différences entre le BPA et le TBBPA. En effet, le TBBPA n'affecte pas les anneaux d'accrétion dans la D-véligère, sauf dans des endroits localisés près de la bordure D de la coquille (pointes de flèche sur la **figure 4B**) ni de la charnière, alors que le BPA affecte la charnière de la coque et semble avoir un impact plus fort que le TBBPA sur le dépôt de  $\text{CaCO}_3$  (**Figure 4B** rangée du haut).

L'immunoréactivité 5-HT et l'HIS du gène DR1 montrent les défauts de développement neurologique provoqués par les traitements TBBPA/BPA et révèlent davantage de différences dans les effets du TBBPA et du BPA. Le TBBPA et le BPA réduisent tous deux le nombre de cellules sérotoninergiques dans le ganglion 5HT-positif [20, 21] et l'apparition de neurites sortant de ce ganglion neural (**Figure 4B** rangée du milieu). En revanche, l'HIS de DR1 révèle des différences frappantes entre le TBBPA et le BPA. Le TBBPA diminue considérablement l'expression de DR1 dans la marge D de la coquille en croissance (à 32 hpf) tandis que l'expression de DR1 dans la charnière de la coquille ne semble pas affectée. En revanche, le BPA n'a aucun effet évident sur l'expression de DR1 à ce stade (**Figure 4B**). Cette observation suggère que le BPA et le TBBPA ont des modes d'action toxiques différents dans les larves de *Mytilus*.

## DISCUSSION/CONCLUSION

Le développement larvaire de *Mytilus* (de différentes espèces) a été exploité par des tests d'embryotoxicité standards conçus par l'Organisation internationale de normalisation - ISO ([www.iso.org](http://www.iso.org)) et ASTM international [14] et utilisés dans de nombreux laboratoires depuis plusieurs décennies. En effet, le développement des embryons et des larves peut être facilement surveillé et échantillonné à l'aide des protocoles de tests biologiques embryo-larvaires utilisant des espèces de moule [22]. De plus, en raison de la petite taille des larves de *Mytilus* (un demi-millimètre), de leur vitesse de développement (larves D-véligères entièrement calcifiées en 48 heures) et du phénotypage morphologique facile et rapide, les tests embryo-larvaires peuvent être miniaturisés et effectués à une vitesse élevée et à haut débit ce qui est important pour un outil de surveillance.

Cependant, le fait de n'avoir que 3 critères d'évaluation morphologiques rend difficile la distinction des différents types de toxicité et ne permet pas de caractériser des phénotypes spécifiques de la coquille ou du développement neurologique. La coloration fluorescente de la croissance de la coquille avec le CalcoFluor/Calcéine ainsi que la coloration immunohistochimique/HIS des cellules neurales peuvent fournir des informations plus approfondies pour permettre de mieux discriminer les différents phénotypes induits par différents toxiques.

Nous avons montré ici deux techniques complémentaires pour analyser la morphogénèse de la coquille embryonnaire (colorants vitaux et HIS). L'imagerie 3D des larves colorées au CalcoFluor/calcéine par microscopie confocale permet une quantification fine de la croissance de la coquille qui est essentielle à la caractérisation des processus de développement impliqués dans la formation de la coquille larvaire de tous les bivalves et pas seulement de *Mytilus galloprovincialis* [30]. Une telle quantification fournit également certains critères de toxicité sublétaux qui peuvent se révéler plus sensibles que l'unique phénotypage morphologique. L'analyse par hybridation *in situ* (HIS) apporte des informations moléculaires liées à l'expression embryonnaire des gènes qui jouent un rôle déterminant dans la construction de réseaux de régulation des gènes (GRN) participant à la formation de la coquille embryonnaire ainsi que des « adverse outcome pathways » (AOP) décrivant les modes d'action des toxiques. En effet, certains toxiques pourraient avoir des impacts similaires sur le développement larvaire et la morphogénèse de la coquille mais avec des cibles et des événements moléculaires différents (et donc affectant différemment les GRN) conduisant aux phénotypes observés. Parce que l'HIS n'est pas quantitative, elle doit être utilisée en parallèle avec la qPCR pour



concevoir des GRN testables qui sous-tendent la biogenèse de la coquille larvaire ou les AOP.

Ensuite, nous avons montré comment l'immunohistochimie du neurotransmetteur suivie d'une imagerie confocale 3D peut documenter l'initiation de la neurogénèse avec une résolution cellulaire et comment certains toxiques peuvent affecter le neurodéveloppement. Là encore, l'analyse HIS complète bien l'immunohistochimie en diversifiant le nombre de voies neuronales à étudier (là où aucun bon anticorps n'est disponible) et en faisant la lumière sur les GRN impliqués dans le développement neuronal et leur dérégulation. En couplant tous ces protocoles avec une approche pharmacologique, nous avons démontré le contrôle neuroendocrinien de la biogenèse de la coquille chez *M. galloprovincialis* [20].

Nous avons d'abord constaté que l'apparition des systèmes sérotoninergique et dopaminergique se produit au cours du développement larvaire précoce de *M. galloprovincialis*, conduisant à la génération de populations neuronales distinctes au début de la croissance de la coquille [20, 21]. De plus, la signalisation dopaminergique régule la biogenèse de la coquille larvaire de *M. galloprovincialis*, car le récepteur de la dopamine 1 (DR1) est localisé dans les tissus responsables de la biogenèse de la coquille. Le contrôle neuroendocrinien de la morphogénèse de la coquille a en outre été suggéré par l'observation du blocage pharmacologique de DR1 qui est capable d'arrêter l'ensemble du processus de biogenèse et de développement de la coquille larvaire [21]. Enfin, les enzymes anaboliques et cataboliques de la dopamine sont constamment exprimées tout au long du développement de la coquille. Ces observations confirment que la dopamine est un agent morphogénétique puissant dans la biogenèse de la coquille larvaire de *M. galloprovincialis* [21].

Si le processus de biogenèse de la coquille larvaire chez les mollusques bivalves est régulé par la signalisation neuroendocrinienne des monoamines sérotonine et dopamine, ces voies devraient être étudiées après exposition aux perturbateurs endocriniens à activité neuroendocrinienne pour prouver le mode d'action de ces classes de toxiques sur les bivalves.

En effet, nos travaux et ceux d'autres personnes suggèrent jusqu'à présent que les effets néfastes de l'exposition au BPA et au TBBPA sur les larves de moules pourraient être dûs à la perturbation des voies de signalisation neuroendocriniennes [20, 21]. Il a déjà été démontré que le BPA affecte le développement larvaire de *M. galloprovincialis* dans le test d'embryotoxicité de 48 h dans une large gamme de concentrations, y compris les concentrations environnementales [22]. De plus, le



BPA a significativement affecté la transcription de plusieurs gènes, dont le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>1</sub> ainsi que ceux impliqués dans la biominéralisation [31]. Le BPA pourrait également induire une localisation ectopique et une diminution du nombre de neurones 5-HT-ir, accompagnée d'un effet significatif sur les niveaux d'expression du récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>1</sub> [20]. Le TBBPA a altéré l'ensemble du processus de biogenèse de la coquille larvaire et a affecté le développement des systèmes dopaminergique, sérotoninergique et GABAergique [21]. Ainsi, une voie plausible de résultats indésirables (AOP) de l'action du BPA et du TPBPA sur les premiers stades larvaires de *M. galloprovincialis* implique une interférence avec la synthèse des neurotransmetteurs sérotonine et dopamine en tant qu'événement initiateur moléculaire, ce qui entraîne finalement une morphogenèse de la coquille altérée et un arrêt du développement dans les larves de *Mytilus* [21]. Il est important de noter que la gamme de concentrations utilisées dans nos études est proche de la quantité des deux produits chimiques trouvés dans l'environnement, ce qui suggère que l'AOP identifié pourrait être impliqué dans les conséquences néfastes sur les populations de *Mytilus* et de bivalves [21].

Les exemples du BPA et du TBBPA soutiennent fortement que la signalisation neuroendocrinienne effectuée par le système monoaminergique pourrait être une cible sensible des produits chimiques perturbateurs neuroendocriniens dans le développement des mollusques bivalves, et la première preuve diagnostique d'un tel mécanisme est le développement défavorable de la larve. Une telle perturbation neuroendocrinienne peut aussi se produire dans d'autres invertébrés puisque les neurotransmetteurs et les neurohormones, et en particulier les monoamines, sont les principales molécules de signalisation du système neuroendocrinien de nombreux invertébrés [32, 33]. Cependant, les éléments de diagnostic neuroendocriniens, tels que le développement de la coquille chez les mollusques bivalves, doivent d'abord être découverts et caractérisés pour chaque type d'invertébrés.

Enfin, tous les protocoles décrits ici peuvent être facilement appliqués à d'autres espèces d'invertébrés calcifiants et sont très utiles dans le domaine des études Evo-dévo et de la toxicologie environnementale. Parce que toutes ces techniques utilisent l'imagerie pour collecter les résultats, elles peuvent être appliquées dans des criblages/tests à haut débit par l'automatisation de l'acquisition et de l'analyse d'images et nous sommes convaincus qu'elles joueront un rôle déterminant dans la toxicologie du 21<sup>ème</sup> siècle.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. 2022
2. CARRIER T.J., REITZEL, AM. & HEYLAND, A. Evolutionary ecology of marine invertebrate larvae. Oxford University Press, 2018 and references quoted therein
3. GOSLING E.: Marine Bivalve Molluscs. John Wiley & Sons, Ltd; 2015.
4. GIRIBET, G & EDGECOMBE, GD. 44. Lophotrochozoa: The Invertebrate Tree of Life, Princeton University Press, 2020, pp. 346-350.
5. KNIPRATH E. Ontogeny of the Molluscan Shell Field: a Review. *Zool Scripta* 1981, **10**, 61–79.
6. KNIPRATH E. Larval development of the shell and the shell gland in *Mytilus* (Bivalvia). *Wilhelm Roux' Archiv* 1980, **188**, 201–204.
7. WILSON-SANDERS SE. Invertebrate Models for Biomedical Research, Testing, and Education. *ILAR Journal*, 2011, **52**, 126–52.
8. BORETTI A. & ROSA L.: Reassessing the projections of the World Water Development Report. *npj Clean Water*, 2019, **2** (15)
9. ORTEGA A. & OLIVARES-BANUELOS TN.: Neurons and Glia Cells in Marine Invertebrates: An Update. *Front Neurosci.* 2020, **14**, 121
10. KURITA Y, DEGUCHI R, Wada H. Early Development and Cleavage Pattern of the Japanese Purple Mussel, *Septifer virgatus*. *Zoological Science* 2009, **26**, 814–820.
11. MARIN F. The formation and mineralization of mollusk shell. *Front Biosci* 2012, **S4**, 1099–1125.
12. FALINI G & FERMANI S. Chitin Mineralization. *Tissue Engineering* 2004, **10**, 1–6.
13. RAMESH K, MELZNER F, GRIFFITH AW, GOBLER CJ, ROUGER C, TASDEMIR D, et al. In vivo characterization of bivalve larval shells: a confocal Raman microscopy study. *J R Soc Interface* 2018, **15**, 20170723.
14. ASTM, 1994. Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. Annual book of standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Vol 11.05, pp. 223-240.
15. YURCHENKO OV, SAVELIEVA AV, KOLOTUCHINA NK, VORONEZHSKAYA EE, DYACHUK VA. Peripheral sensory neurons govern development of the nervous system in bivalve larvae. *EvoDevo*, 2019, **10**, 22.
16. VORONEZHSKAYA EE, NEZLIN LP, ODINTSOVA NA, PLUMMER JT, CROLL RP. Neuronal development in larval mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia). *Zoomorphology* 2008, **127**, 97–110.

17. LIU Z, WANG L, YAN Y, ZHENG Y, GE W, LI M, et al. D1 dopamine receptor is involved in shell formation in larvae of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology* 2018, **84**, 337–342.
18. LIU Z, ZHOU Z, ZHANG Y, WANG L, SONG X, WANG W, et al. Ocean acidification inhibits initial shell formation of oyster larvae by suppressing the biosynthesis of serotonin and dopamine. *Science of The Total Environment* 2020, **735**, 139469.
19. MIGLIOLI A., DUMOLLARD R., BALBI T., BESNARDEAU L. AND CANESI L. Characterization of the main steps in first shell formation in *Mytilus galloprovincialis*: possible role of tyrosinase. *Proc. R. Soc. B.* 2019 **286**, 20192043
20. MIGLIOLI, A., BALBI, T., BESNARDEAU, L., DUMOLLARD, R., & CANESI, L. Bisphenol A interferes with first shell formation and development of the serotonergic system in early larval stages of *Mytilus galloprovincialis*. *Science of The Total Environment*, 2021, **758**, 144003.
21. MIGLIOLI, A., BALBI, T., MONTAGNA, M., DUMOLLARD, R., & CANESI, L. Tetrabromobisphenol A acts a neurodevelopmental disruptor in early larval stages of *Mytilus galloprovincialis*. *Science of The Total Environment*, 2021, **793**, 148596.
22. FABBRI R, MONTAGNA M, BALBI T, RAFFO E, PALUMBO F, CANESI L. Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 2014, **99**, 1–8.
23. KAPSENBERG L, MIGLIOLI A, BITTER MC, TAMBUTTÉ E, DUMOLLARD R, GATTUSO J-P. Ocean pH fluctuations affect mussel larvae at key developmental transitions. *Proc. Royal Soc. B: Biological Sciences* 2018, **285**, 20182381.
24. ZHAO, R, TAKEUCHI, Takeshi, LUO, YJ, et al. Dual gene repertoires for larval and adult shells reveal molecules essential for molluscan shell formation. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, **35**(11), 2751-2761.
25. LI H, WANG D, DENG Z, HUANG G, FAN S, ZHOU D, LIU B, ZHANG B, YU D. Molecular characterization and expression analysis of chitinase from the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 2017, **203**, 141-148.
26. KAPSENBERG L., BITTER MC., MIGLIOLI A., PELEJERO C., GATTUSO JP., DUMOLLARD R., Molecular basis of ocean acidification sensitivity and adaptation in *Mytilus galloprovincialis*. *iScience*, 2022, **25**(8), 104677.
27. HUAN P, LIU G, WANG H, LIU B. Identification of a tyrosinase gene potentially involved in early larval shell biogenesis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Genes Evol.* 2013, **223**, 389–394.
28. YANG B, PU F, LI L, YOU W, KE C, FENG D. Functional analysis of a tyrosinase gene involved in early larval shell biogenesis in *Crassostrea angulata* and its response to ocean acidification. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2017, **206**, 8–15.

29. REN, G., CHEN, C., JIN, Y., ZHANG, G., HU, Y., SHEN, W. A novel tyrosinase gene plays a potential role in modification the shell organic matrix of the triangle mussel *Hyriopsis cumingii*. *Front. Physiol.* 2020, **11**, 100.
30. MIN Y, LI Q, YU H. Characterization of larval shell formation and CgPOU2F1, Cg-Sox5, and CgPax6 gene expression during shell morphogenesis in *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*; 2022, **263**, 110783.
31. BALBI T, FRANZELLITTI S, FABBRI R, MONTAGNA M, FABBRI E, CANESI L. Impact of bisphenol A (BPA) on early embryo development in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: Effects on gene transcription. *Environmental Pollution* 2016, **218**, 996–1004.
32. JOYCE A, VOGELER S. Molluscan bivalve settlement and metamorphosis: Neuroendocrine inducers and morphogenetic responses. *Aquaculture* 2018, **487**, 64–82.
33. MALAGOLI D, OTTAVIANI E. Cross-talk among immune and neuroendocrine systems in molluscs and other invertebrate models. *Hormones and Behavior* 2017, **88**, 41–4. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.10.015>

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Laurent Gilletta, Alexandre Jean, Axel Duchene et le Centre de Ressources Biologiques Marines du CRBM-IMEV soutenu par EMBRC-France, dont les fonds publics français sont gérés par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dans le cadre du programme « Investissement d'Avenir » (ANR-10-INBS-02) ; Lydia Besnardeau et les membres du groupe Ascidian BioCell. R.D. et A.M. ont été soutenus par une bourse de l'Agence Nationale de la Recherche (MusMod4EDC, N° : ANR-21-CE34-0006-01, France), et A.M a également été soutenue par le programme de doctorat en sciences marines, DISTAV de l'Université de Gênes.