



**HAL**  
open science

# Production et caractérisation de familles de palourdes japonaises, *Ruditapes philippinarum*, résistantes à la maladie de l'anneau brun

Fanny Jeffroy

► **To cite this version:**

Fanny Jeffroy. Production et caractérisation de familles de palourdes japonaises, *Ruditapes philippinarum*, résistantes à la maladie de l'anneau brun. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2011. Français. NNT : . tel-00770804

**HAL Id: tel-00770804**

**<https://theses.hal.science/tel-00770804>**

Submitted on 9 Jan 2013

**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.

# UBO

université de bretagne  
occidentale



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*Mention : Biologie marine*  
**École Doctorale : EDSM**

présentée par

**Fanny JEFFROY**

Préparée à l'Unité Mixte de Recherche 6539,  
au LEMAR (Laboratoire des sciences de  
l'Environnement Marin), de l'IUEM (Institut  
Universitaire Européen de la Mer) à Plouzané

## Production et caractérisation de familles de palourdes japonaises, *Ruditapes philippinarum*, résistantes à la maladie de l'anneau brun



**Thèse soutenue le 19 décembre 2011**

devant le jury composé de :

**Bassem ALLAM**

Professeur, Université de Stony Brook / Rapporteur

**Alain VAN WORMHOUDT**

Directeur de Recherche CNRS, Concarneau / Rapporteur

**Jean LAROCHE**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Brest / Examineur

**Abdelaziz HEDDI**

Professeur, INSA Lyon / Examineur

**Caroline FABIoux**

Maître de conférence, UBO, Brest / Examineur

**Marie-Agnès TRAVERS**

Chercheur Ifremer, La Tremblade / Examineur

**Christine PAILLARD**

Directeur de Recherche CNRS / Directeur de thèse

**Jean-François AUVRAY**

SATMAR / Membre invité



Cette thèse a été financée par la Région Bretagne et l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) dans le cadre d'une bourse à Convention Industrielle de Formation par le Recherche (CIFRE).

## Remerciements

*Je remercie Bassem Allam et Alain Van Wormhoudt d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et également les autres membres du jury : Jean Laroche, Caroline Fabioux, Marie-Agnès Travers et Abdelaziz Heddi.*

*Merci à ma directrice de thèse Christine Paillard de m'avoir acceptée pour réaliser ce travail et qui m'a laissé beaucoup d'indépendance.*

*Merci à Jean-Francois Auvray de la SATMAR de Marennes d'avoir eu confiance en moi au cours de cette thèse et d'avoir participé à son financement grâce à la bourse CIFRE.*

*Je remercie Noël Derrien et Adrien Bontemps de la SATMAR (Ile Tudy et Leucate) qui m'ont aidée à produire des larves et à cultiver de belles palourdes.*

*Merci à Charles Aveline et à Jacques et Jean-Jacques Cadoret de m'avoir prêté une parcelle de leur concession pour la culture des palourdes à Landéda et à Carantec.*

*Une pensée aux copains du LEMAR et à mes colocataires de bureau : Nelly, Marie-Agnès, Morgane, Marie, Hansy, Caroline, les Aurélie, Adeline, David, Hélène, les Franck, Leila, Jean-Philippe, Tony, Cédric, Nolwenn, Morgana, Philippe, Christophe, Marcel...*

*Merci à Maximilien, Adrien et Julien pour l'aide qu'ils m'ont apporté pendant leur stage.*

*Je remercie Geneviève Cohat et Anne-Sophie Podeur pour la gestion des papiers administratifs de tous genres.*

*Je tiens à remercier les quelques milliers de palourdes qui ont participé à l'obtention des résultats de cette thèse.*

*Je remercie mes parents qui soutiennent mes ambitions depuis toujours, mes sœurs et ma belle-famille.*

*Je tiens particulièrement à remercier Julien Le Grand, mon préféré qui est le papa de mes deux fils, qui m'a suivie depuis l'autre bout du monde pour que je fasse cette thèse et qui m'a soutenue du début jusqu'à la fin. Je remercie mes petits gars, Lucien et Malo, pour leurs sourires du matin et du soir.*

# Table des matières

Index des figures et tableaux .....	10
Résumé .....	16
Liste des abréviations .....	18
<b>Introduction générale .....</b>	<b>20</b>
<b>Chapitre 1: Introduction bibliographique .....</b>	<b>26</b>
1- Maladies infectieuses des invertébrés marins .....	28
2- Susceptibilité et résistance aux maladies infectieuses .....	29
2-1-Qu'est ce qu'un individu résistant ? .....	29
2-2-Sélection d'animaux résistants par amélioration génétique .....	30
3- Biomarqueurs pour la sélection d'animaux résistants .....	32
3-1-Hémocytes .....	33
3-1-1-La phagocytose .....	34
3-1-2-Les réactions humorales .....	36
3-1-2-1-L'Oxyde nitrique .....	37
3-1-2-2-L'activité phénol-oxydase .....	39
3-1-3-La capacité d'adhérence .....	40
3-2-Outils génétiques .....	41
3-2-1-Les microsatellites .....	41
3-2-2-Les banques soustractives .....	42
4- Modèle biologique : <i>Ruditapes philippinarum</i> .....	43
4-1- Classification taxonomique .....	43
4-2- Aire de répartition mondiale .....	44
4-3- Biologie .....	45
4-3-1-Anatomie .....	45
4-3-2-Reproduction et cycle de vie .....	47
4-4-Production .....	48
4-4-1 Productions mondiale et française .....	48
4-4-2 Production en milieu contrôlé .....	49

4-5-Maladie de l'Anneau Brun (MAB) .....	49
4-5-1-L'agent pathogène de la maladie .....	50
4-5-2-Colonisation de la bactérie et formation de l'anneau brun .....	52
4-5-3-Physiologie de la palourde face à la MAB .....	53
4-5-4-Moyens de défense chez <i>R. philippinarum</i> .....	54
4-5-5 Signe de résistance à la MAB .....	55
<b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes .....</b>	<b>56</b>
1- Sélection des géniteurs .....	58
1-1- Provenance des sites de cultures .....	58
1-2- Lot de production des géniteurs .....	58
2- Juvéniles de la première génération .....	59
2-1- Pontes et stades larvaires .....	69
2-2- Semis sur trois sites .....	61
3- Mesures de la taille des animaux .....	62
4- Diagnostic du développement du dépôt de conchioline et de la réparation coquillière .....	62
5- Inoculation par solution bactérienne .....	63
5-1-Suspension de <i>Vibrio tapetis</i> .....	63
5-2- Inoculation .....	64
6- Mesures des paramètres hématocytaires .....	64
6-1- Concentration hématocytaire totale (THC) et viabilité .....	64
6-2- Test d'adhérence couplé au dosage de l'oxyde nitrique .....	65
6-2-1- Mesure de l'adhérence .....	65
6-2-2- Dosage de l'oxyde nitrique .....	66
6-3- Activité de phagocytose .....	66
6-4- Mesures des Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS) .....	67
6-5- Dosage des protéines .....	67
6-6- Activité Phénol-Oxydase (PO) .....	67
7- Détermination des génotypes des microsattellites .....	68
7-1- Extraction de l'ADN .....	68
7-2- Amplification : PCR .....	68
7-3- Electrophorèse .....	69

8- Hybridation Soustractive Suppressive (SSH) .....	69
9- Mesure de la transcription de gènes .....	70
10- Analyses statistiques .....	70
<b>Chapitre 3 : Induction de l'Oxyde Nitrique (NO) par les hémocytes de la palourde japonaise, <i>Ruditapes philippinarum</i>, après un contact <i>in vitro</i> avec <i>Vibrio tapetis</i> .....</b>	<b>72</b>
1- Introduction .....	74
2- Article 1 : Involvement of Nitric Oxide in the <i>in vitro</i> interaction between Manila clam, <i>Ruditapes philippinarum</i> hemocytes and the bacterium <i>Vibrio tapetis</i> .....	75
<b>Chapitre 4: Sélection des géniteurs .....</b>	<b>80</b>
1- Sélection des géniteurs de Landéda suite à une incubation bactérienne (Janvier 2008)..	84
1-1 Incubation après inoculation par <i>Vibrio tapetis</i> et Diagnostic de la MAB .....	84
1-2 Evolution des géniteurs sélectionnés.....	87
2- Sélection des géniteurs de Chausey (août 2008) .....	89
2-1 Paramètres hématocytaires pour les lots R et S .....	90
2-2 Corrélations entre paramètres hématocytaires .....	91
2-3 Analyses multivariées des paramètres sur les deux lots de Chausey .....	93
3- Sélection de géniteurs par analyses de paramètres hématocytaires sur des géniteurs de Landéda (avril 2009) .....	95
3-1 Résultats généraux.....	95
3-2 Résultats par jour de prélèvement d'hémolymphe .....	95
4- Effet du prélèvement de l'hémolymphe sur le développement de la MAB de l'île Tudy... 101	
4-1- Schéma expérimental .....	101
4-2- Etat physiologique hématocytaire de base des animaux .....	102
4-3- Influence du prélèvement sur la MAB .....	105
4-3-1- Paramètres hématocytaires .....	105
4-3-2- Développement de la maladie et réparation coquillère .....	108
4-3-3- Cas du NO .....	110
5- Discussion générale .....	113
<b>Chapitre 5 : Détermination de la parenté par un outil génétique et par un caractère phénotypique de la coquille .....</b>	<b>118</b>
1-Détermination de la parenté par un outil génétique : microsatellite .....	121



1-1 Analyses microsatellites des deux populations : Lot PJ-06-07 et Lot PJ-06-10.	121
1-2 Croisements effectués .....	121
1-3 Génotypes des parents .....	122
1-4 Apparentement .....	123
2- Détermination de la parenté par un caractère phénotypique de la coquille .....	124
Article 2: Shell color and shell pattern as a complementary tool of microsatellites for <i>Ruditapes philippinarum</i> family identification in field experiments.....	125
<b>Chapitre 6 : Comparaison des performances physiologiques des familles en « common gardens » et au laboratoire .....</b>	<b>138</b>
1-Tests préliminaires sur les larves de palourdes : effet de <i>V. tapetis</i> .....	142
2- Suivi en common garden .....	144
2-1 Températures des sites .....	144
2-2 Répartition des familles dans les deux lots PJ-08-R1 et PJ-08-R2 .....	145
2-3 Croissance des coquilles .....	147
2-4 Prévalence de la MAB .....	149
3- Paramètres hématocytaires sur des juvéniles de l'île Tudy en Juin 2009 .....	152
3-1 Concentration et viabilité hématocytaire .....	153
3-2 Capacité d'adhérence .....	153
3-3 Concentration en NO .....	154
4- Comparaison du développement de la MAB et de la réparation de la coquille (Rab) sur les familles des trois sites suite à l'inoculation du <i>V. tapetis</i> .....	156
4-1 Concentration et viabilité hématocytaire .....	156
4-2 Capacité d'adhérence .....	158
4-2-1 Animaux témoins .....	158
4-2-2 Animaux inoculés .....	159
4-3 Concentration en NO .....	160
4-3-1 Animaux témoins .....	160
4-3-2 Animaux inoculés .....	162
4-4 Prévalence de la MAB et réparation coquillière .....	163
4-5 Expression de transcrits de gènes .....	167

<b>Chapitre 7 : Identification d'ESTs d'intérêt suite à une infection <i>in vivo</i> de palourdes japonaises <i>Ruditapes philippinarum</i>, par la bactérie <i>Vibrio tapetis</i> et expression différentielle au niveau du manteau et des hémocytes .....</b>	<b>172</b>
1- Introduction .....	174
2- Article 3: Identification of genes that are differentially expressed in <i>Ruditapes philippinarum</i> mantle through a <i>Vibrio tapetis</i> incubation .....	175
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>196</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>204</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>220</b>
Analyse génétiques sur les palourdes des lots R et S.....	221
Communications scientifiques.....	224



## Index des Figures

- Fig. 1 : Schéma simplifié de la relation hôte-Pathogène-Environnement engendrant une maladie.....p28
- Fig. 2 : Processus de phagocytose de *V. tapetis* par les hémocytes de la palourde japonaise *R. philippinarum* .....p35
- Fig. 3 : Schéma de la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote .....p37
- Fig. 4 : Biosynthèse d'oxyde nitrique (NO) par la NOS .....p38
- Fig. 5 :Système de l'activation de la pro-phénoloxydase des arthropodes et réactions en chaîne menant à la synthèse de mélanine .....p39
- Fig. 6 : Aire de répartition mondiale de la palourde japonaise et date d'introduction .....p44
- Fig. 7 : Orientation postéro-ventrale de la palourde japonaise .....p46
- Fig. 8 : Coupe transversale de la palourde japonaise .....p47
- Fig. 9 : Photo de palourde vidée présentant un anneau brun .....p50
- Fig.10 : Photo en microscopie électronique à balayage de bactéries *Vibrio tapetis*.adhérentes au périostracum de la palourde .....p52
- Fig. 11 :Echelle de classification des symptômes de la Maladie de l'Anneau Brun représentée en stade de développement du dépôt de conchyoline .....p53
- Fig.12 : Schéma conceptuel du développement de la MAB à l'échelle individuelle .....p54
- Fig. 13 : Photo de la table de ponte pouvant accueillir une soixantaine de géniteurs .....p61
- Fig. 14 : Bacs pour les développements larvaires .....p61
- Fig. 15 : Sites des semis dans le Finistère des familles des deux lots PJ-08-R1 et PJ-08-R2 .....p62
- Fig. 16 : Exemple de cytogramme de la concentration et la viabilité cellulaire de l'hémolymphe .....p65
- Fig. 17 : Schéma de la distribution des individus selon leur caractère résistant/tolérant ou sensible/susceptible à la maladie de l'anneau par leur niveau de réparation coquillière .....p84

Fig. 18 : Proportion d'individus diagnostiqués par stade de réparation .....	p86
Fig .19 : Analyse en composante principale sur les paramètres hématocytaires des lots R (PJ-06-10) et S (PJ-06-9) .....	p93
Fig. 20 : Régression multiple des individus du lot R (PJ-06-10 de Chausey) .....	p94
Fig. 21: Schéma expérimental de l'étude de l'effet du prélèvement de l'hémolymphe sur le développement de la MAB. ....	p102
Fig. 22 : Proportion des stades de maladie des individus non ponctionnés et ponctionnés après inoculation de <i>V. tapetis</i> .....	p109
Fig. 23 : Proportion des stades de réparation des individus non ponctionnés et ponctionnés après inoculation de <i>V. tapetis</i> .....	p109
Fig. 24 : Concentration moyenne d'Oxyde Nitrique ( $\mu\text{M}$ ) des individus des quatre conditions .....	p110
Fig. 25 : Effet du prélèvement de l'hémolymphe et du conditionnement en eau renouvelée ou non renouvelée sur la concentration de NO ( $\mu\text{M}$ ).....	p111
Fig. 26 : Photo d'une palourde dégradée .....	p143
Fig. 27 : Larves dégradées par différentes concentrations de <i>V. tapetis</i> à 24, 48 et 72 heures d'incubation par balnéation .....	p143
Fig. 28 : Températures dans les sites étudiés sur l'année 2009 .....	p144
Fig. 29 : Distribution des familles des lots PJ-08-R1 et PJ-08-R2 d'avril 2009 à juillet 2010 sur les trois sites .....	p146
Fig.30 : Taille moyenne des lots PJ08 R1 et R2 au moment des semis .....	p147
Fig. 31 : Evolution de la taille moyenne des coquilles de palourdes des trois sites par lot de pontes de la date de semis à Juillet 2010 .....	p148
Fig. 32 : Evolution de la taille de la coquille (mm) par famille de Janvier 2009 à Juillet 2010 sur les trois sites .....	p149
Fig.33 : Evolution de la prévalence des familles de Janvier 2009 à Juillet 2010 sur les trois sites .....	p151
Fig. 34 : Pourcentage des individus par stade de maladie sur les familles des trois sites en avril 2010	p152
Fig. 35 : Concentration cellulaire en $10^6 \text{cellules.ml}^{-1}$ et viabilité des hémocytes de l'hémolymphe pour chaque famille de palourdes .....	p153

Fig. 36 : Cellules non adhérees et ratio d'adhérence des différentes familles de palourdes .....	p154
Fig. 37 : Concentration NO ( $\mu\text{M}$ ) par famille de palourdes .....	p182
Fig.38 : Concentration hémocytaire de l'hémolymphe en cellules.ml <sup>-1</sup> des 5 familles sur les trois sites .....	p157
Fig. 39 : Pourcentage de viabilité des hémocytes des 5 familles sur les trois sites de culture.....	p157
Fig. 40 : Pourcentage de cellules non adhérees et ratio d'adhérence des familles en condition témoin sur les trois sites de culture .....	p159
Fig. 41 : Pourcentage de cellules non adhérees et ratio d'adhérence des familles en condition inoculée sur les trois sites de culture .....	p189
Fig. 42 : Concentration et production de NO ( $\mu\text{M}$ ) des familles en condition témoins des trois sites de culture .....	p160
Fig. 43 : Concentration et production de NO ( $\mu\text{M}$ ) sur les familles en condition inoculées des trois sites de culture .....	p162
Fig. 44 : Histogramme des stades de maladie des familles par site de culture et par condition témoin ou inoculés .....	p164
Fig. 45 : Histogramme des stades de réparation de la maladie des familles par site de culture et par condition témoin ou inoculés .....	p166
Fig. 46 : Niveau d'expression des transcrits du gène Beta cell translocation ....	p168
Fig. 47 : Niveau d'expression des transcrits du gène Early growth response ....	p169
Fig. 48 : Schéma global des données obtenues sur les familles, sur les géniteurs et sur les populations naturelles .....	p206



## Index des Tableaux

Tab. 1 : Synonymie de la palourde japonaise .....	p43
Tab. 2 : Caractéristique des géniteurs utilisés pour les expérimentations .....	p59
Tab. 3 : Amorces des 6 microsatellites de <i>Ruditapes philippinarum</i> .....	p69
Tab. 4 : Nombre de palourdes restantes avant chaque étape de la sélection depuis la récolte sur le terrain jusqu'à la biopsie du manteau .....	p85
Tab. 5 : Nombre de palourdes sélectionnées et croisements de géniteurs envisagés .....	p86
Tab. 6 : Nombre restant et pourcentage de mortalité des palourdes testées avant leur envoi à Marennes et avant leur envoi à Leucate .....	p88
Tab 7 : Paramètres physiologique de l'hémolymphe des lots R et S de Chausey .	p90
Tab. 8 : Coefficients de corrélation entre les paramètres hématocytaires pour les lots R et S de Chausey .....	p92
Tab. 9 : Moyenne des paramètres physiologiques des lots R et S de Landéda.....	p96
Tab. 10: Coefficients de corrélation entre les paramètres hématocytaires pour les lots R et S de Landéda .....	p97
Tab. 11: Paramètres physiologique de l'hémolymphe des lots R et S de l'île Tudy .....	p97
Tab. 12 : Moyenne et erreur standard des paramètres de l'hémolymphe au premier prélèvement .....	p103
Tab. 13 : Moyenne et erreur standard des paramètres de l'hémolymphe sur les quatre conditions .....	p107
Tab. 14 : Analyses statistiques de l'effet de la date d'expérimentation et de la ponction d'hémolymphe sur les paramètres hématocytaires .....	p108
Tab. 15 : Origine et croisement de géniteurs des pontes de l'année 2008 .....	p122
Tab. 16 : Génotypes des géniteurs des familles des lots de pontes PJ-08-R1 et PJ-08-R2 de 6 loci microsatellite.....	p123
Tab.17 : Récapitulatif des avantages et inconvénients des méthodes expérimentales pour la sélection de géniteurs et ses alternatives .....	p202





## Résumé

La culture de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, en Bretagne s'est estompée à partir des années 80 après l'apparition de la vibriose appelée Maladie de l'Anneau Brun (MAB). Cette maladie est causée par la présence de la bactérie *Vibrio tapetis* qui provoque un dépôt caractéristique de conchyoline sur le bord interne des valves des palourdes. Les animaux parviennent à réparer la coquille au niveau des dépôts de conchyoline par un phénomène de recalcifcation. Des géniteurs et des familles de palourdes ont été étudiés afin de différencier les individus les moins sensibles à cette maladie. Ainsi, ces études ont permis de discriminer deux familles montrant des caractères de défense immunitaires différents au niveau des paramètres hématocytaires et au niveau du développement de la MAB. De plus, il a été démontré que le *V. tapetis* induit une production de l'oxyde nitrique *in vitro* dans les hémocytes de la palourde japonaise. Enfin, les approches moléculaires ont permis de mettre en évidence l'expression spécifique de deux transcrits de gènes (carbonique anhydrase like et inhibiteur de sérine protéases (serpine)) dans le manteau en lien avec le développement de la MAB.

Mots clés : Palourde, *Ruditapes philippinarum*, maladie de l'anneau brun, *Vibrio tapetis*, hémocytes, immunité, sélection, résistance.

## Abstract

The culture of Manila clams in Brittany has faded from the 80 years after the onset of the disease called vibriosis of the Brown Ring (MAB). This disease is caused by the presence of the bacterium *Vibrio tapetis* causes a characteristic conchiolin deposit on the inner edge of the valves of the clams. The animals are able to repair the shell at the conchiolin deposits by a phenomenon of recalcification. Broodstock was selected according to their stage of disease development after inoculation of bacteria into the pallial cavity or following their physiological response in the hemolymph. Families of clams were produced and comparisons of the response to the disease were made between families in order to differentiate with the least susceptible individuals to this disease. Thus, these studies have to distinguish two families showing different characteristics of the immune level and hemocyte parameters in the development of the MAB. A relationship between families and ornamentation/color of the shell has been detected and enabled, in the thesis, to differentiate families in addition to the microsatellite tool. Moreover, it was shown that the *V. tapetis* induces production of nitric oxide *in vitro* in hemocytes of Manila clams. Moreover, when NO production is inhibited, the number of adherent cells decreases. Finally, molecular approaches have helped to highlight the specific expression of two gene transcripts (carbonic anhydrase like and serpin) in the mantle related to the development of the MAB.

Key words : Clam, *Ruditapes philippinarum*, Brown Ring Disease, *Vibrio tapetis*, hemocytes, immunity, selection, resistance.



## Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucleique  
ADNc : Acide Désoxyribonucleique complémentaire  
ARN : Acide ribonucleique  
ARNm : Acide Ribonucleique messenger  
BRD : Brown Ring Disease  
BSA : Serum Bovin Albumin  
CA : Carbonic Anhydrase  
CDS : Conchiolin Deposit Stage  
CECT : Collection Espagnole de Cultures Types  
CNA : Cellules Non Adhérées  
DCF-DA : 2',7'-DichloroFluorescein DiAcetate  
DMSO : Dimethylsulfoxyde  
DOPA : 3,4- DihydroxyPhénylAlanine  
dNTP : Deoxy nucleotides triphosphates  
EMSF : Eau de Mer Stérile Filtrée  
ENR : Eau Non Renouvelée  
ER : Eau Renouvelée  
ERO : Espèces réactives de l'Oxygène  
ERN : Espèces réactives de l'azote  
ESTs : Expressed Sequenced Tags  
GFP : Green Fluorescent Protein  
iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible  
IP : Iodure de Propidium  
L-DOPA : L-dihydrophénylalanine  
L-NAME : N nitro L-Arginine MethylEster  
LPS : Lipopolysaccharide  
MAB : Maladie de l'Anneau Brun  
MgCl<sub>2</sub> : Chlorure de magnésium  
MMLV : Moloney Murine Leukemia Virus  
NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide  
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate  
NO : Nitric Oxide  
NOS : Nitric oxide synthase  
Oligo dT : Oligonucleotide deoxyThymidine  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
pH : Potentiel Hydrogène  
PMA : Phorbol Myristate Acetate  
PRP : Pathogen Recognition Pattern  
PO : Phénol Oxydase  
QTL : Quantitatif Trait Locus  
QPX : Quahog Parasite X  
RAB : Réparation de l'Anneau Brun  
ROS : Reactive Oxygen Species = ERO  
RT : Reverse transcription

RT-PCR : Real time PCR  
Serpine : Serine protease inhibitor  
SSH : Suppressive Subtractive Hybridization  
SOD : Super oxide dismutase  
SRS : Shell Repair Stages  
SSW : Sterile Sea Water  
TAMRA : Carboxytetramethylrhodamine  
THC : Total Hemocyte Count  
T<sub>m</sub> : Temperature of melting

# **Introduction générale**



## Introduction générale

La palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* est une des espèces de bivalves la plus consommée dans le monde. Elle représente avec la culture d'huîtres, de moules et de coquille Saint Jacques une production annuelle de plus de 7 millions de tonnes (FAO, 2007). La production de bivalves française place la France en 7ème position mondiale. La palourde japonaise a été importée en France dans les années 70 (Flassch et Le Borgne, 1992) et sa production représente un marché socio-économique de grande importance. Une chute brutale de la production suite à d'importante mortalité est parvenue à la fin des années 80 avec l'apparition de la Maladie de l'Anneau Brun (MAB) (Paillard et Maes, 1990) dans les Abers en Nord Finistère alors que la production annuelle atteignait les 500 tonnes. Cette maladie est une vibriose causée par la bactérie *Vibrio tapetis*.

La maladie de l'anneau brun est caractérisée par des symptômes visibles sur la coquille que sont le développement du dépôt brun de conchyoline, matière organique synthétisée par le bivalve et une recalcification de la coquille en recouvrant ce dépôt de conchyoline. Le diagnostic des stades de maladie est alors un outil majeur pour différencier les animaux suivant leur résistance ou leur susceptibilité face à la MAB.

Le développement de population de palourdes cultivées à caractère moins susceptible à la MAB a été mené par la SATMAR depuis une dizaine d'années. Les animaux d'une population sur plusieurs générations développent moins de maladie et réparent davantage la coquille affectée que des populations standards (Trinkler et al, 2010).

Les études menées sur les cellules de l'immunité sont nombreuses (Oubella et al, 1994, 1996 ; Allam et al, 2000, 2001, 2006 ; Paillard et al, 2004) mais peu concernent les phénomènes de résistance. Allam et collaborateurs (2001) ont montré des mécanismes de défense de la palourde japonaise associés dans la résistance face à la MAB par comparaison entre des populations américaines et françaises. Les palourdes japonaises cultivées aux Etats-Unis



montrent une concentration hémocytaire, un pourcentage de granulocytes et une activité de phagocytose plus élevés et une prévalence de la maladie plus faible suite à une exposition au *V. tapetis* que les palourdes japonaises de France.

Des études de sélections ont déjà bien avancé pour d'autres espèces de bivalves afin de caractériser génétiquement la résistance à une maladie pathogénique (Dégremont et al, 2010 ; Simonian et al, 2009). Des travaux de génétiques quantitatives ont permis d'identifier des QTLs (Quantitative Trait Locus) associés à la résistance à la Bonamiose (Lallias et al, 2009). Les données génétiques liées à la résistance de la MAB n'ont pas encore été entreprises.

Dans ce contexte, il apparaît nécessaire d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de défense en comparant les réponses des familles biparentales de palourdes japonaises. Pour cela, des familles doivent être produites à partir de géniteurs sélectionnés selon leur potentiel de résistance au niveau de biomarqueurs hémocytaires et de la prévalence de la MAB. L'apport de ces nouvelles données sur les familles a pour perspectives de sélectionner des palourdes résistantes à la Maladie de l'Anneau Brun et de relancer la production de cette espèce aquacole en Bretagne notamment dans le site des Abers où l'exploitation était importante avant l'apparition de la maladie.

Le travail de thèse a contribué à produire des familles de palourdes japonaises à partir de géniteurs sélectionnés par leur caractère de résistance ou de susceptibilité face à la MAB par l'intermédiaire de biomarqueurs physiologiques et génétiques.

Le premier chapitre de ce manuscrit est une synthèse bibliographique succincte sur les maladies des invertébrés marins, sur la résistance associée aux maladies suivie des biomarqueurs permettant de sélectionner des animaux résistants et particulièrement la palourde japonaise *R. philippinarum*.

Le second chapitre résume le matériel et les méthodes mis en place pour répondre aux objectifs de cette thèse avec tout d'abord les productions des familles puis les mesures des biomarqueurs.

Les chapitres suivants concernent les travaux réalisés au cours de la thèse et les résultats obtenus.

Dans le troisième chapitre, le dosage de l'Oxyde Nitrique (NO) a permis de montrer que suite à un contact de *V. tapetis*, une baisse de la concentration de NO par inhibition de l'oxyde nitrique synthase est associée à une diminution de l'adhérence des hémocytes.

Le quatrième chapitre traite des sélections successives effectuées sur des géniteurs. Ce chapitre illustre les difficultés concernant les analyses réalisées au niveau individuel et celles liées à la survie et au succès de reproduction des géniteurs suite aux expérimentations.

Le cinquième chapitre concerne la détermination de la parenté des familles de première génération par l'utilisation du phénotype de la coquille.

Le chapitre suivant décrit le suivi sur le terrain et au laboratoire des familles de la première génération.

Le dernier chapitre traite de l'acquisition de données moléculaires obtenues au niveau du manteau par une banque soustractive suppressive afin de rechercher des gènes impliqués spécifiquement dans la MAB.



# **Chapitre 1 :**

## **Introduction bibliographique**



## 1- Maladies infectieuses des Invertébrés marins

La niche écologique des invertébrés marins des zones côtières est riche en biodiversité. Les variations de paramètres environnementaux de température, salinité, turbidité jouent un rôle sur la croissance des invertébrés marins mais aussi sur le développement d'éventuels agents pathogènes (virus, bactéries, champignons, parasites). Le développement des agents pathogènes induit alors diverses maladies plus ou moins spécifiques selon l'origine de l'agent pathogène. L'ensemble des paramètres environnementaux propices au développement de la virulence de l'agent pathogène et défavorable pour l'hôte entraîne l'apparition de la maladie (Fig. 1).

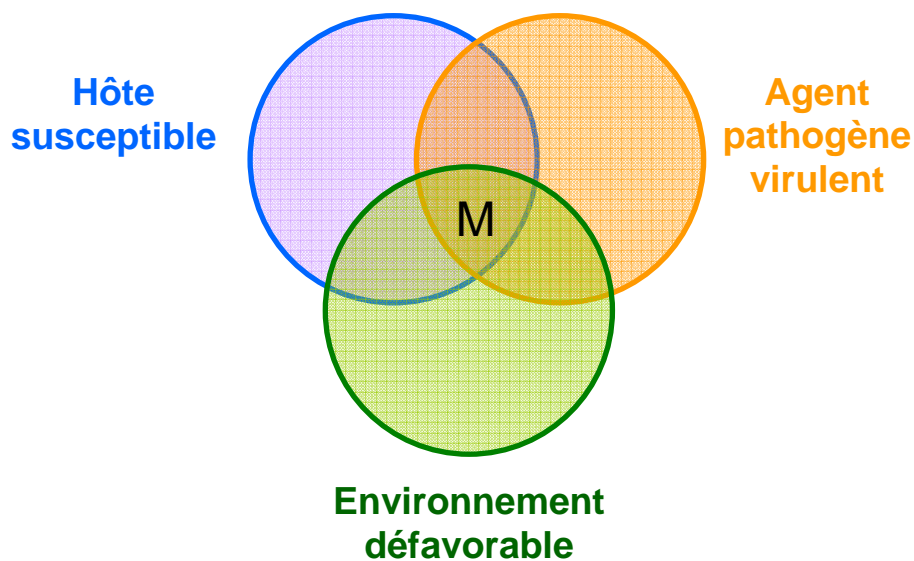


Fig. 1: Schéma simplifié de la relation hôte-Pathogène-Environnement engendrant une maladie M (partie commune aux trois cercles) (d'après Snieszko, 1973).

Les maladies chez les organismes marins, proviennent de différents agents pathogènes. Concernant les parasites, *Marteilia* agent de la marteliose et *Bonamia*, celui de la bonamiose ont induit des mortalités massives dans les populations d'huitres plates *Ostrea edulis*; et *Perkinsus*, l'agent de la

Perkinsose, affectent de nombreuses familles de bivalves. L'origine virale avec l'*Iridovirus* (Comps et Duthoit 1976), l'Herpèsvirus (Renault *et al.*, 1994, Le Deuff *et al.*, 1995) chez les huîtres et les particules virus-like chez les palourdes (Dang *et al.*, 2009) est aussi très fréquente. L'origine bactérienne, principalement par les vibrioses, est recensée dans le monde entier sur une large gamme d'espèces hôtes. Les vibrioses se retrouvent chez les crevettes (Lightner et Redman., 1998 ; Saulnier *et al.*, 2000), les ormeaux (Travers *et al.*, 2008), les huîtres (Sugumar *et al.*, 1998) et les palourdes (Borrego *et al.*, 1996). Des origines fongiques sont connues chez des crustacés (pour revue, Cawthorn 2011). Récemment, l'interaction entre plusieurs agents pathogènes (*Herpes-virus* et *Vibrios*) ont été suspectées dans la cause des mortalités estivales des huîtres creuses (Waechter *et al.*, 2002, Gay *et al.*, 2004).

Les maladies provoquent des modifications de la physiologie des animaux comme des diminutions de la croissance coquillière, de l'indice de condition et mais aussi des baisses de stocks de production aquacole. Certaines maladies ont entraîné de fortes baisses de cultures en France comme la culture de l'huître plate, *O. edulis*, par le parasite *Bonamia* (Grizel *et al.*, 1974) et la production de la palourde japonaise par la présence de *Vibrio tapetis*. L'huître portugaise *Crassostrea angulata* a totalement disparu des côtes françaises suite à l'infection des populations par l'*Iridovirus* (Comps *et al.*, 1976). Certaines maladies infectieuses touchent autant les larves que les adultes, et d'autres maladies sont davantage recensées sur des jeunes animaux plutôt que sur les adultes ou vice versa comme pour la maladie de l'anneau brun (Pour revue Paillard *et al.*, 2004).

## **2- Susceptibilité et résistance aux maladies infectieuses**

### **2-1-Qu'est ce qu'un individu résistant ?**

La résistance à une maladie peut être définie par la lutte efficace permettant de survivre dans un environnement hostile composé de stress de nature biotique ou abiotique. Les individus d'une même population répondent indépendamment les uns des autres aux stress par leur capacité à faire face

à la maladie. Chaque individu a alors sa propre susceptibilité pour une maladie donnée. La susceptibilité élevée décrit l'état d'une sensibilité alors que la susceptibilité très faible, voire inexistante, définira une résistance à la maladie.

L'animal dit résistant à une maladie ne présentera pas de symptômes. La susceptibilité n'est pas gouvernée uniquement par l'immunité mais également par le comportement des individus des populations exposés aux agents pathogènes. Ces comportements peuvent être illustrés par exemple par des alimentations différentes qui découlent directement de l'environnement.

L'origine de la résistance à une maladie est souvent génétique. La notion de l'exploitation de la variabilité génétique des bivalves résistants à des agents pathogènes est commentée par Quillet et ses collaborateurs (2007).

Dans notre étude, la résistance de la maladie de l'anneau brun est représentée soit par des palourdes apparaissant asymptomatiques (porteur sain de *V. tapetis*), soit par des palourdes arrivant à réparer totalement la coquille après avoir lutté contre la bactérie.

## 2-2-Sélection génétique d'animaux résistants

Les études sur des capacités de résistance à des maladies sont nombreuses chez les invertébrés du fait de leur importance économique. La sélection des populations les plus résistantes ou les moins susceptibles se fait par pression de sélection en exposant les populations aux agents pathogènes soit en milieu contrôlé en laboratoire soit en milieu naturel déjà contaminé par l'agent infectieux responsable de la maladie.

En milieu contrôlé, et particulièrement dans le secteur de l'aquaculture, les sélections ont alors pour fonction de faire disparaître les populations ou les individus les plus sensibles au profit des populations à potentiel résistant aux maladies afin de satisfaire le développement économique.

Alcivar-Warren et ses collaborateurs (1997) ont décrit des origines génétiques de la susceptibilité des crevettes *Penaeus vannamei* au virus *Baculovirus penaei* grâce à la réalisation des croisements.

La moule, *Mytilus galloprovincialis* semble moins sensible que les huitres et les palourdes face aux vibrioses (Mar Costa *et al.*, 2008). Elle est très étudiée



afin de comprendre quels agents immunitaires sont responsables de cette meilleure tolérance (Venier *et al.*, 2011). Des études comparatives entre la moule et l'huître face aux vibrioses sont en cours dans le cadre d'un Programme Européen Bivalife (2011-2013), coordonné par T. Renault auquel l'équipe IHP du LEMAR (Plouzané) participe. Par ailleurs, des sélections par croisement d'huîtres plates résistantes à *Bonamia* correspondant à une plus forte survie par rapport à des populations standard ont été entreprises (Naciri-Graven *et al.*, 1998, Culloty *et al.*, 2004).

La modulation de la microflore comme l'utilisation de probiotiques apporte une autre forme de résistance. Elle permet en milieu de culture contrôlé d'induire la résistance à la vibriose des crevettes de Nouvelle-Calédonie *Litopenaeus stylirostris* (Castex *et al.*, 2010).

Des critères de résistance sont étudiés chez les bivalves. Plusieurs populations d'huîtres plates ont été confrontées à *Bonamia* afin de comparer leur résistance (da Silva *et al.*, 2008). De nombreux travaux ont été entrepris sur les populations d'huîtres creuses sujettes aux mortalités estivales. Par la génétique, des programmes de sélection à grande échelle sont réalisés par identification de critères de résistance aux pathogènes. Ainsi, des familles résistantes et sensibles ont été sélectionnées au cours du défi MOREST (Samain et Mc Combie, 2007). Un lot suggéré comme résistant à la mortalité estivale chez *C. gigas* montre depuis 6 générations une plus faible mortalité que les lots témoins et sensibles (Cochennec-Laureau *et al.*, 2011) dont le caractère de résistance semble héréditaire. De plus, Dégremont et ses collaborateurs (2010) ont montré la résistance d'huîtres juvéniles face à l'herpes-virus.

La détermination de QTL a permis d'identifier des marqueurs associés à des gènes de résistance à *Bonamia* chez *O. edulis* (Lallias *et al.*, 2009a) et des gènes de survie chez *C. gigas* (Sauvage *et al.*, 2010) ainsi que des QTLs liés à la résistance à la maladie MSX chez l'huître *C. virginica* (Yu et Guo, 2006). La sensibilité à la vibriose par le *V. splendidus* et *V. aesturianus* semble liée à des bases génétiques chez l'huître creuse (De Decker, 2010). Des injections de *Vibrio* en laboratoire ont permis d'obtenir des taux de survie supérieurs

dans les familles issues d'huîtres dites résistantes par rapport aux familles issues d'huîtres dites sensibles.

Dans les années 1970, une population d'huîtres *Crassostrea virginica* résistante au parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX) a été identifiée (Haskin et Ford, 1978). Des études comparatives sur les concentrations en protéines de l'hémolymphe de populations résistantes et susceptibles ont été décrites (Ford, 1986).

Une autre espèce d'huîtres, l'huître australienne *Crassostrea glomerata* est étudiée grâce à des programmes de sélection pour la résistance à la marteliose QX (Simonian *et al.*, 2009 ; Dang *et al.*, 2011).

L'étude de populations sur différents critères de susceptibilité à la bonamiose permet de mieux comprendre comment les animaux se défendent face aux attaques pathogéniques et de trouver, grâce à la génomique, des gènes associés à la résistance tels que celui de la cathepsine surexprimé dans les hémocytes d'individus résistants exposés à *Bonamia* (Morga *et al.*, 2011). La majorité des études de sélection concernent les huîtres. Des études sur la palourde japonaise nécessitent d'être approfondies afin de mieux identifier des animaux résistants à la maladie de l'anneau brun ou MAB (voir section Modèle biologique) dans le but de relancer la production vénéricole française. En effet, une première approche de sélection a été entreprise depuis le début des années 2000 après avoir montré que un lot de palourdes cultivé alors dans le Morbihan développait beaucoup moins les symptômes de la MAB que les autres lots cultivés (Soudant *et al.*, 2004). Depuis, des populations successives à partir de ce lot moins sensible ont été produites. La production de familles biparentales à partir d'individus de ce lot permettrait alors de mieux comprendre l'origine génétique de la sensibilité à la MAB. Afin de sélectionner des géniteurs suivant leur caractère plus ou moins sensibles à la MAB des critères physiologiques sont mesurés.

### **3- Biomarqueurs pour la sélection d'animaux résistants**

Les biomarqueurs se définissent par des paramètres biochimiques, moléculaires, cellulaires, physiologiques ou comportementaux pouvant être

mesurés suite à un stress au niveau des organismes entiers, au niveau tissulaire ou au niveau des fluides.

Pour notre étude, la nature du stress est l'infection par *V. tapetis*. Les paramètres choisis concernent principalement ceux impliqués dans la défense immunitaire et donc ceux en relation avec les hémocytes et le plasma dans lequel ils baignent. Dans les populations de *R. philippinarum* européennes et de la côte est des Etats-Unis, des paramètres hémocytaires ont été rapportés dans diverses études liées à la MAB, suite ou non à une inoculation de *V. tapetis*, sur le terrain ou en laboratoire (Paillard *et al.*, 1994, 1995 ; Oubella *et al.*, 1993, 1994, 1996 ; Ford et Paillard, 2007 ; Allam et Paillard, 1998, Allam *et al.*, 2000a, 2000b, 2001, 2002a, 2006 ; Reid *et al.*, 2003 ; Flye Sainte-Marie *et al.*, 2007a, 2009a). Plus récemment une étude a montré une différence de susceptibilité face à la MAB sur plusieurs générations entre deux stocks aquacoles de palourdes japonaises (Trinkler *et al.*, 2010). Les biomarqueurs recherchés concernent ceux impliqués dans la résistance à la MAB associés soit à des capacités de lutte contre la bactérie sans qu'il y ait de développement de symptômes soit à des capacités de réparation coquillière ou guérison.

A ce jour, aucune donnée sur les paramètres hémocytaires n'a été apportée au niveau individuel sur des populations de palourdes d'écloserie à susceptibilité différentielle face à la MAB.

### 3-1-Les hémocytes

Chez les invertébrés, l'hémolymphe participe à différents processus physiologiques : digestion, transport de métabolites, réparation coquillière (Mount *et al.*, 2004 ; Trinkler *et al.*, 2011). Mais, de par sa constitution en hémocytes, un de ses rôles majeurs est de participer aux mécanismes de défense immunitaire (pour revue, Donaghy *et al.*, 2009).

Les cellules circulantes de défense ou hémocytes baignent dans le plasma de l'hémolymphe et des fluides extrapalléaux. L'hémolymphe circule à travers l'organisme grâce au système circulatoire semi-ouvert en contact avec les tissus. Chez les bivalves, les fluides extrapalléaux sont en contact avec le manteau et la coquille (Allam et Paillard, 1998.)

Les différents types d'hémocytes sont caractérisés par leur morphologie ou leurs composants métabolites et leur fonction. Chez la palourde japonaise, trois types de cellules hémocytaires sont recensées : les granulocytes (cellules granuleuses), les hyalinocytes (cellules agranuleuses) et les blastes (Auffret, 1988, Allam *et al.*, 2002, Matozzo *et al.*, 2008).

Les paramètres environnementaux influent sur la concentration en hémocytes de *R. philippinarum*. Soudant *et al.*, 2004 ont montré qu'avec des températures estivales plus élevées, la concentration en hémocytes totaux (THC) était plus élevée. D'autre part, l'effet combiné d'une température élevée à 30°C à une forte salinité (38‰) affecte des réponses fonctionnelles des hémocytes de la palourde japonaise (Munari *et al.*, 2011).

Une augmentation des cellules de l'hémolymphe serait liée à l'alimentation et aux périodes de reproduction chez l'huître et la palourde (Ford *et al.*, 1993, Oubella *et al.*, 1994 ; Delaporte *et al.*, 2003).

L'environnement cellulaire peut jouer sur la morphologie des hémocytes. En effet, un arrondissement des cellules suite à une exposition à du cuivre (Fagotti *et al.*, 1996) ou à un contact bactérien a été démontré (Choquet *et al.*, 2003).

### 3-1-1 Phagocytose

Le processus biologique de phagocytose permet l'élimination de petites particules telles que les virus et les bactéries. La membrane cytoplasmique de l'hémocyte englobe la particule étrangère après sa reconnaissance et son adhésion. Le phagosome internalise la particule puis fusionne avec des lysosomes pour former un phagolysosome qui sera par la suite détruit par des molécules (enzymes lysosomiales et espèces réactives de l'oxygène).

Des variations dans l'activité de phagocytose ont été démontrées suite à des stress bactériens ou selon différentes conditions environnementales. Une baisse de la phagocytose est observée chez la palourde européenne *Ruditapes decussatus* en présence du parasite *Perkinsus atlanticus* (Ordas *et al.*, 1999). Des palourdes japonaises de la côte ouest des Etats-Unis présentent une activité de phagocytose plus importante que celle des populations françaises de cette espèce (Allam *et al.*, 2001). De plus, une

baisse de la phagocytose intervient en période de reproduction chez l'huître et chez l'ormeau (Delaporte *et al.*, 2006, Gagnaire *et al.*, 2006, Travers *et al.*, 2008) et après à une augmentation de la température (Hégaret et Wikfors, 2005a, 2005b).

La phagocytose du *V. tapetis* par les hémocytes de *R. philippinarum* est illustrée dans la figure 2.

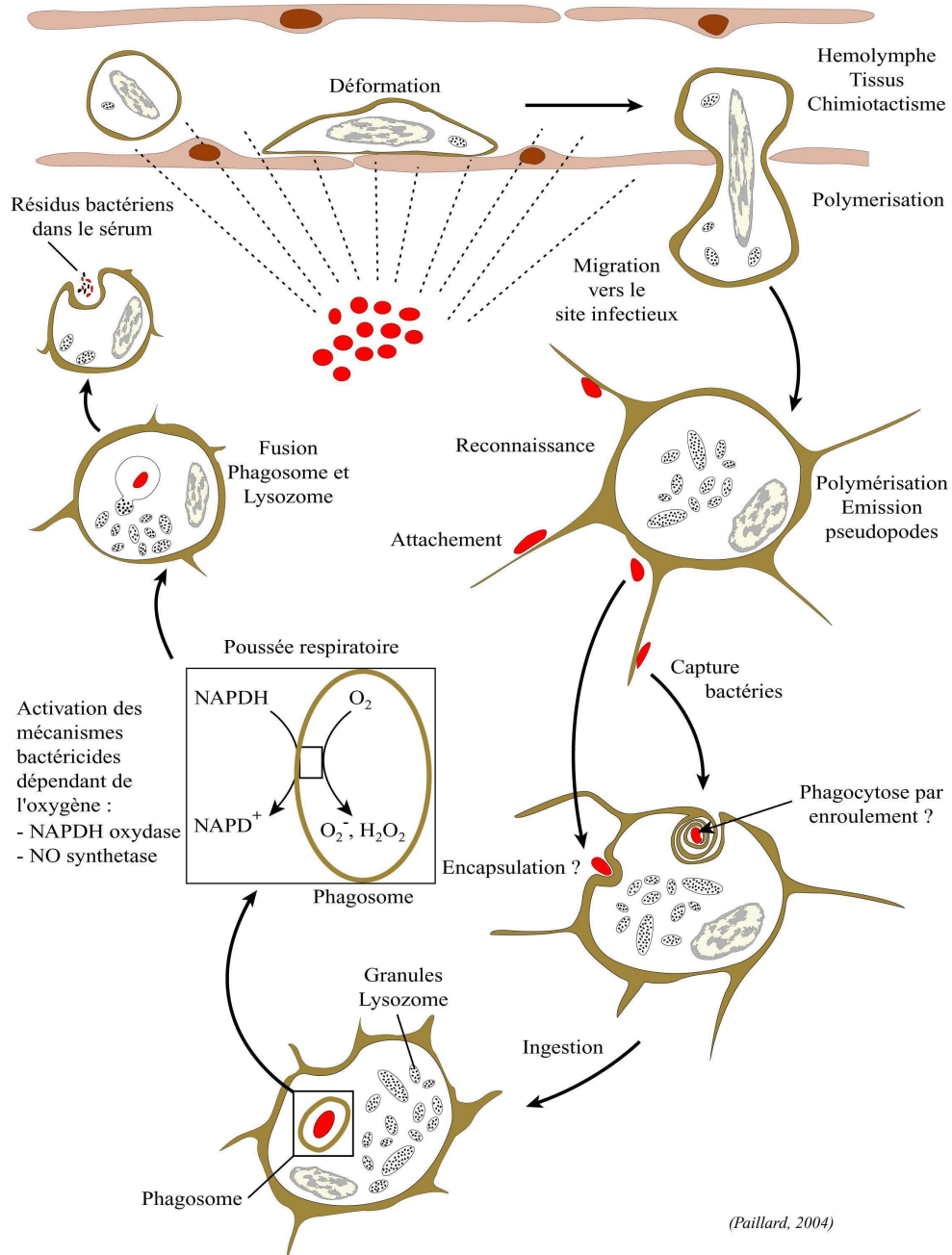


Fig. 2 : Processus de phagocytose de *V. tapetis* par les hémocytes de la palourde japonaise *R. philippinarum*. (Paillard, 2004)

### 3-1-2-Les réactions humorales

L'immunité humorale se traduit par l'intervention de molécules solubles à caractère cytotoxique produites par les hémocytes. Les effecteurs humoraux tels que les peptides antimicrobiens, les inhibiteurs de protéases, les enzymes lysosomiales, les lectines interviennent dans la réponse hémocytaire. En effet, les hémocytes des bivalves synthétisent par exemple les lectines ayant un rôle de reconnaissance et d'agglutination de microbes tandis que les peptides antimicrobiens (defensin, mytilin, ...) ont principalement une fonction bactéricide. Des peptides antimicrobiens ont été identifiés suite à des challenges bactériens chez la palourde européenne ou chez la palourde japonaise (Gestal *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2010).

Les enzymes lysosomiales contenues dans l'hémolymphe émanent des hémocytes et sont d'autres facteurs intervenant dans le processus immunitaire comme la lysozyme ou la Leucine Amino Peptidase (LAP) (Oubella *et al.*, 1994).

L'existence de mémoire immunitaire spécifique commence à être acceptée chez les invertébrés (Rowley et Powell, 2007). Chez le gastéropode *Biomphalaria glabrata*, des molécules proches des immunoglobulines, les IgSF présentent une hypervariabilité génétique rappelant le système de reconnaissance des Ig des vertébrés. Une telle mémoire immunitaire n'a pas été démontrée chez la palourde japonaise. Cependant, récemment des expériences ont été menées afin de voir l'effet d'une inoculation répétée sur des paramètres hémocytaires, le développement du dépôt brun et sur la réparation. Il semble que des individus déjà exposés à la bactérie développent une réparation plus rapide (Trinkler, 2009).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (oxygène O<sub>2</sub>, superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>, radical hydroxyl OH, peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et azotées (RNS) (oxyde nitrique NO, peroxydinitrite ONOO) participent à la réponse immunitaire après une stimulation des hémocytes par des agents bactériens. Ces ROS et RNS sont utiles pour la destruction des pathogènes. Elles sont composées de radicaux libres tels que le radical hydroxyl (OH), les ions peroxydes et l'oxyde

nitrique NO (Fig. 3). Ces radicaux étant très réactifs peuvent également être nocifs aux cellules de l'organisme lorsqu'ils sont présents en grande quantité. Leur dégradation est contrôlée par l'intervention d'enzymes antioxydantes. Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  est généré par l'intervention de la superoxyde dismutase. La catalase dégrade le peroxyde d'hydrogène en  $O_2$  et  $H_2O$ . L'ion superoxyde ( $O_2^-$ ), en présence de l'oxyde nitrique (NO) produit du peroxynitrite (ONOO).

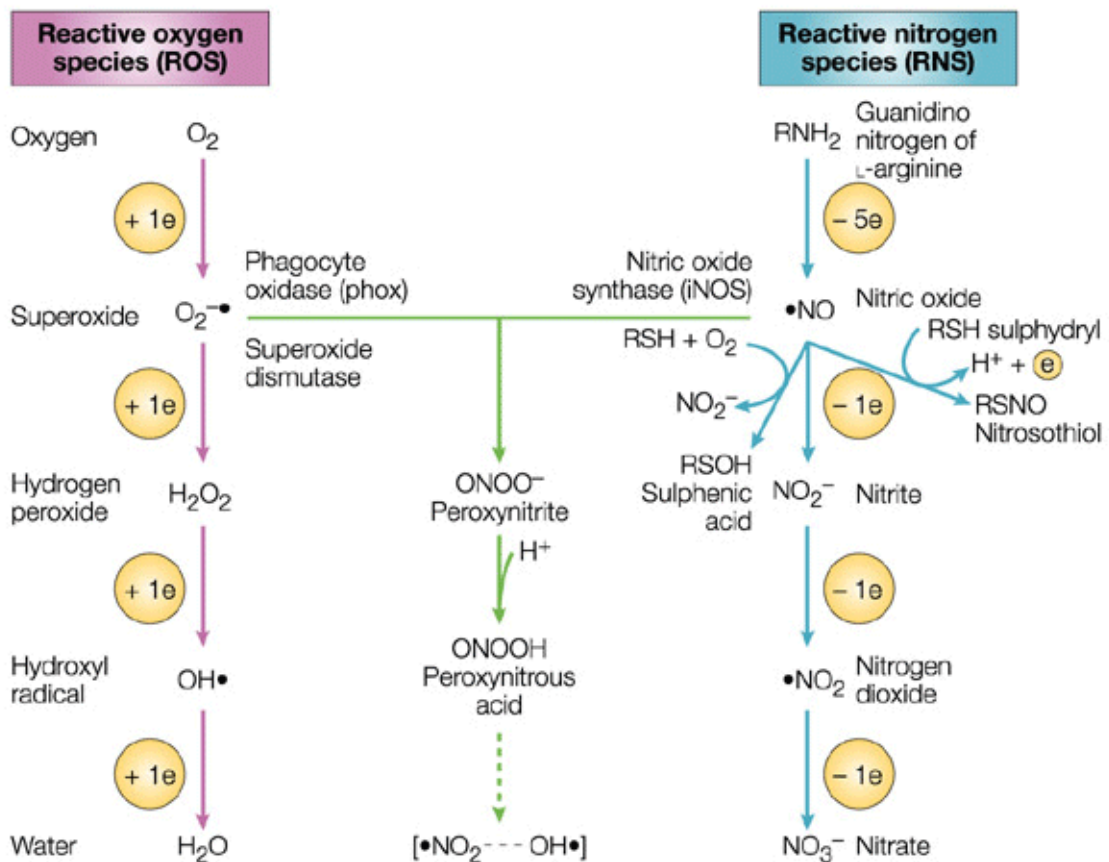


Fig. 3: Schéma de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS). D'après la revue de Fang 2004.

### 3-1-2-1-L'oxyde nitrique

Le NO est une molécule radicalaire peu stable.

La nitrique oxyde synthase (NOS) produit l'oxyde nitrique (NO) en transformant la L-arginine en L-citrulline en présence d'oxygène (Fig. 3 et 4). Le radical NO agit avec le dioxygène pour produire du  $NO_3^-$  et  $NO_2^-$ . Ces

deux composés sont mesurables par différentes méthodes spectrométriques comme celle de la réaction de Griess (cf chapitre 2 : matériels et méthodes).

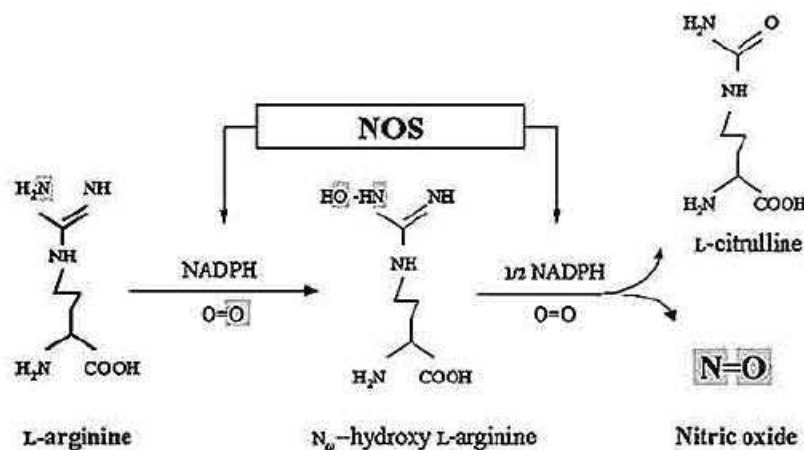


Fig. 4: Biosynthèse d'oxyde nitrique (NO) par la NOS d'après Torreilles, 2001.

La synthèse du NO est induite par la stimulation des hémocytes en présence de particules microbiennes. La molécule de NO est toxique pour les agents pathogènes mais à une certaine concentration, elle devient toxique pour les cellules de l'hôte. Produite par induction par les hémocytes, le NO a pour rôle de détruire les bactéries empêchant leur multiplication.

Des productions de NO engendrées par des agents pathogènes ou des substances bactériennes ont été estimées chez la moule de Méditerranée *Mytilus galloprovincialis*, chez l'huître américaine (Villamil *et al.*, 2007), chez la palourde européenne *R. decussatus* (Novas *et al.*, 2007 ; Taffala *et al.*, 2003, Mar Costa *et al.*, 2008). Par contre, aucune mesure sur la production de NO chez *R. philippinarum* n'a encore été faite.

Chez les vertébrés, il existe trois formes de Oxyde Nitrique Synthase (NOS) : 1) nNOS ou NOS I forme retrouvée dans les cellules nerveuses, 2) iNOS ou NOS II forme inductible de l'enzyme et 3) eNOS ou NOS III forme retrouvée principalement dans les cellules endothéliales. Mais, chez les invertébrés, la NOS correspond davantage à la forme inductible. Certains auteurs ont montré l'existence d'un pattern d'expression constitutive et inductible de la NOS (Imamura *et al.*, 2002).



### 3-1-2-2 La phénoloxydase

L'activation de la prophénoloxydase (ProPO) est un mécanisme de défense immunitaire chez les invertébrés contre les infections microbiennes (Soderhall et Cerenius, 1998). La cascade de la réaction de la prophénoloxydase en phénoloxydase est stimulée par la présence de peptidoglycane, lipopolysaccharides et de 1-3 B-glucanes (pour revue Cerenius et Soderhall, 2004) (Fig. 5).

Des réactions en cascade par des sérines protéases endogènes permettent le clivage de la ProPO en PO active. La phénoloxydase (PO) catalyse des quinones précurseurs de la mélanine (Soderhall *et al.*, 1994, Kan *et al.*, 2008). Les quinones participent à la défense contre des microorganismes comme les radicaux hydroxyles. Néanmoins, en quantités excessives, les quinones et la mélanine peuvent devenir dangereux pour l'hôte les synthétisant (Kan *et al.*, 2008). La mélanine est un composé bactéricide permettant l'encapsulation de corps étrangers.

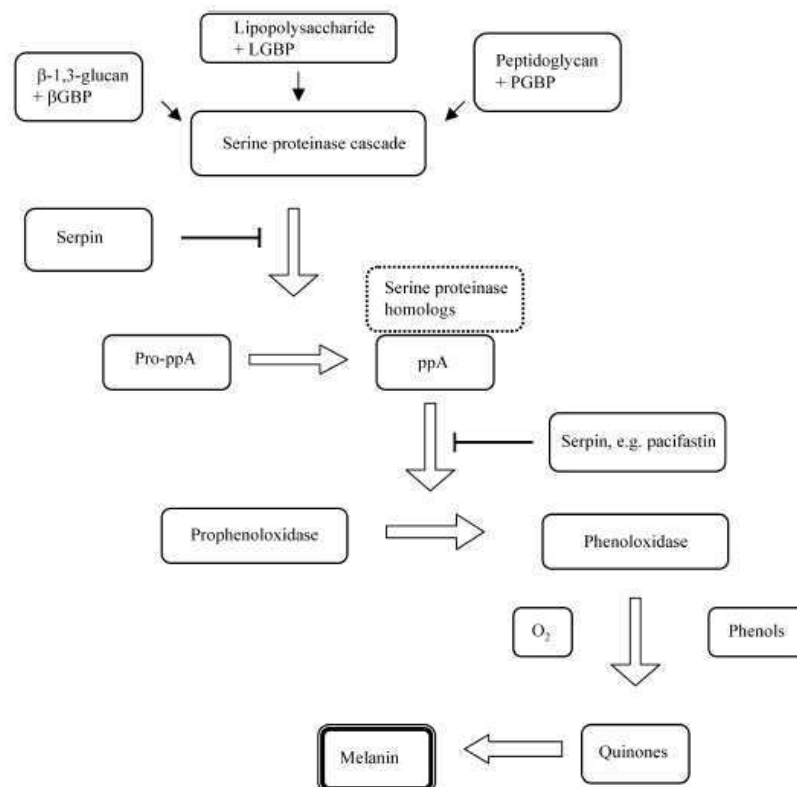


Fig. 5: Système de l'activation de la prophénol-oxydase des arthropodes et réactions en chaîne menant à la synthèse de mélanine (d'après Cerenius et Soderhall, 2004).

Plusieurs études concernent l'activité de la PO chez des invertébrés marins. Munoz et ses collaborateurs (2006) ont montré une activité de la PO des palourdes européennes plus forte pour une infestation faible du parasite *Perkinsus sp* par rapport à une infestation élevée. La présence du *Bonamia sp* semble diminuer l'activité de la PO de *O. edulis* (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003, da Silva *et al.*, 2008). Très récemment, Luna-Acosta et ses collaborateurs (2011) ont démontré que l'activité antimicrobienne chez l'huître *C. gigas* induit les réactions des phénoloxydases et en particulier celle de la laccase.

Un suivi de la PO sur 6 mois a été réalisé sur des populations de palourdes japonaises en effectuant des ponctions d'hémolymphe répétées. Les valeurs les plus fortes sont mesurées lors de la première ponction (Ford et Paillard, 2007). Des animaux présentant au départ du suivi des fortes activités PO sont significativement moins sujets à développer la maladie (Paillard, Comm pers). De plus, cette espèce développe une couche de concholine mélanisée lorsqu'elle est atteinte par la maladie de l'anneau brun. Une relation entre l'activité de la PO et le développement du symptôme de la maladie est suggérée. Une activité de PO plus élevée a été mise en évidence sur des huîtres *S. glomerata* résistantes à la maladie QX (Newton *et al.*, 2004).

D'autre part, les périodes de reproduction et sont mises en cause dans les variations de l'activité PO (Travers *et al.*, 2008). Chez l'ormeau *Haliotis tuberculata*, l'activité PO est plus faible après la période de ponte.

### 3-1-3 La capacité d'adhérence

L'arrondissement des cellules est causée par la diminution des extensions membranaires des hémocytes après des expositions à des agents pathogènes (Lane et Birkbeck, 1999 ; Choquet *et al.*, 2003, Allam et Ford, 2006, Labreuche *et al.*, 2006). Lane et Birkbeck (1999) ont associé l'arrondissement des cellules hémocytaires de la moule à la présence de composés à la surface des bactéries ou à des produits excrétés par les bactéries *V. anguillarum* et *V. alginolyticus*. Plus récemment, Mateo *et al.* (2009) ont injecté *Vibrio splendidus* dans le muscle adducteur de la mye commune *Mya arenaria* et ont observé l'arrondissement des hémocytes

circulants dans l'hémolymphe. Les hémocytes perdant leur adhérence ont plus de difficulté à phagocyter les corps étrangers et peuvent donc moins se défendre. La perte de la capacité d'adhérence des hémocytes suite à l'arrondissement des cellules constitue une réponse caractéristique quantifiable par des mesures en cytométrie en flux. Les souches de *V. tapetis* pathogènes pour la palourde induisent toutes un fort taux de cellules non adhérentes significativement plus fort que celui obtenu avec d'autres espèces de vibrions (Choquet *et al.*, 2003).

### 3-2 Outils génétiques

#### 3-2-1 Les microsatellites

Le génome nucléaire des eucaryotes possède des répétitions de petites séquences appelées minisatellites ou microsatellites suivant la longueur de la séquence répétée et du nombre de répétitions. La séquence la plus souvent identifiée est composée par la répétition de AT. Les minisatellites sont formés par de longues séquences de 10 à 100 pb répétées en tandem jusqu'à 100 fois (Jeffreys *et al.*, 1984). Les microsatellites sont composés de séquences répétées plus courtes (2 à 6 nucléotides). La variabilité de longueur au sein de chaque microsatellite découle de mutation, de délétion ou d'insertion au cours des réplifications. Cependant, ces phénomènes n'interviennent qu'à une fréquence de  $10^{-8}$  à  $10^{-11}$  par paire de bases répliquées (Drake *et al.*, 1998).

Les caractères héréditaires des microsatellites suivent la loi de Mendel. Ainsi, les microsatellites sont des marqueurs de choix pour les analyses de parenté. De nombreux microsatellites ont été identifiés chez de nombreuses espèces de vertébrés, d'invertébrés et de bactéries. Les recherches de nouveaux microsatellites ont été notamment effectuées sur des espèces aquacoles d'intérêts économiques comme les ormeaux, les huîtres et les palourdes afin d'être utilisés dans des études de génétique de populations (Evans *et al.*, 2000, Selvamani *et al.*, 2000; Lallias *et al.*, 2009b, Yasuda *et al.*, 2007). Yasuda et ses collaborateurs (2007) puis An *et al.*, (2010) ont identifié des microsatellites de la palourde japonaise issus de populations de la mer du Japon ainsi que des côtes de la Corée. Ces auteurs ont montré un

polymorphisme important pour certains microsatellites. L'utilisation des loci microsatellites est un atout pour l'élaboration et la reconnaissance des familles au sein d'une population. En milieu contrôlé ou en milieu naturel les populations constituées de plusieurs familles subissent les pressions de sélection de façon similaire. Mélanger les familles lors des pontes permet d'éviter d'éventuels biais au cours des premiers stades de développement larvaires par des effets bacs (Herbinger *et al.*, 1999). Lorsque l'isolation de chaque famille n'est pas réalisable, le mélange des familles en une population est nécessaire, l'analyse par les microsatellites permet alors de retrouver les familles (Zhang *et al.*, 2005).

Cependant, l'outil microsatellite présente quelques faiblesses telles qu'une possible existence d'allèles nuls non détectables lors de l'amplification par PCR dûs à une ou plusieurs bases différentes dans la séquence des amorces. Cette présence d'allèle nul est vérifiable dans la descendance.

### 3-2-2 Les banques soustractives

La réalisation de banques soustractives permet d'identifier des gènes différemment exprimés à partir de séquences clonées après amplification des acides ribonucléiques messagers (ARNm). Les transcrits présentant des redondances importantes ou impliqués dans des fonctions biologiques cibles peuvent alors être utilisés comme biomarqueurs. Depuis la description de la méthode par Diatchenko *et al.* (1996), de nombreux travaux ont permis d'isoler des gènes impliqués dans des réponses face aux stress abiotiques comme des protéines ribosomales chez le pecten *Argopecten purpuratus* et l'huître *C. gigas* (Zapata *et al.*, 2009 ; Meistertzheim *et al.*, 2007 ; Tanguy *et al.*, 2004) et également sur les stress dus aux agents pathogènes chez différentes espèces de mollusques tels que des lectines et la ferritine (Perrigault *et al.*, 2009 ; Song *et al.*, 2006 ; Travers *et al.*, 2010, Morga *et al.*, 2011).

Peu de banques soustractives ont été réalisées spécifiquement sur le manteau de bivalves (Perrigault *et al.*, 2009, Duplat *et al.*, 2006). Cependant, des gènes corrélés à la résistance ont été identifiés au niveau du manteau

dans des populations de *M. mercenaria* considérées résistantes au parasite QPX (Perrigault *et al.*, 2009).

Enfin, une grande quantité de gènes a été identifiée ces dernières années chez la palourde japonaise (Milan *et al.*, 2011 ; Moreira *et al.*, 2012) mais les gènes spécifiquement impliqués suite à un stress par *V. tapetis* n'ont pas encore été mis en évidence.

#### 4- Modèle Biologique *Ruditapes philippinarum*

##### 4-1 Classification taxonomique

La palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeves, 1850) est un mollusque bivalve (Linné, 1758) de l'ordre des Veneroidea (Adams et Reeves, 1850) la famille des vénéridés (Rafinseque, 1815). De nombreux synonymes existent pour cette espèce (Tableau 1).

Tab. 1 : Synonymie de la palourde japonaise (d'après Laruelle, 1994).

Genre	Espèce
<b><i>Ruditapes</i></b>	<i>philippinarum</i>
	<i>semidecussatus</i>
<b><i>Tapes</i></b>	<i>philippinarum</i>
	<i>semidecussatus</i>
	<i>denticulata</i>
	<i>indica</i>
	<i>grata</i>
	<i>quadriradiata</i>
	<i>violenscens</i>
	<i>japonica</i>
	<i>bifurcata</i>
<b><i>Venerupis</i></b>	<i>philippinarum</i>
	<i>semidecussatus</i>
	<i>japonica</i>
<b><i>Venus</i></b>	<i>semidecussatus</i>
	<i>japonica</i>
	<i>tesselata</i>
	<i>semidecussata</i>
<b><i>Amygdala</i></b>	<i>philippinarum</i>
	<i>semidecussata</i>
	<i>japonica</i>
	<i>ducalis</i>
<b><i>Paphia</i></b>	<i>philippinarum</i>
	<i>bifurcata</i>
<b><i>Protothaca</i></b>	<i>bifurcata</i>

#### 4-2 Aire de répartition mondiale

L'aire d'origine de la palourde japonaise est située dans la zone Indopacifique et s'étend de l'Océan Indien (Pakistan 30°N, 65°E), au Pacifique Nord Ouest (îles Kouriles, 65°N, 150°E). Son aire de répartition actuelle est représentée dans la figure 6. La palourde japonaise a d'abord été introduite à des fins aquacoles aux îles Hawaï en 1929 (Yap, 1977), puis accidentellement en 1936 sur la côte Nord Ouest des Etats-Unis où des populations naturelles s'y développent. Par la suite, la palourde japonaise a été introduite en France à partir de 1972 et en Grande Bretagne à la fin des années 70 (Flassch et Le Borgne, 1992). La capacité de croissance plus rapide de la palourde japonaise par rapport à l'espèce autochtone *R. decussatus* a permis une production florissante. Les reproductions naturelles ont permis son installation dans les baies en Atlantique Nord Est et en Méditerranée (Grande Bretagne, France, Espagne, Italie).

Les travaux conduits par l'IFREMER ancien CNEXO avaient permis d'aboutir dès 1978 à une production de 1500kg sur le site de l'île Tudy en Sud-Finistère (Flassch, 1988). La production de la palourde japonaise en France a, par la suite, eu un essor important à partir des années 80 dans les abers du Finistère Nord, dans le golfe du Morbihan, dans la baie d'Arcachon et à Marennes Oléron. La pratique de la vénériculture en éclosérie a permis d'obtenir des larves et des naissains et d'augmenter considérablement la production de cette espèce (Lucas, 1976,1977).

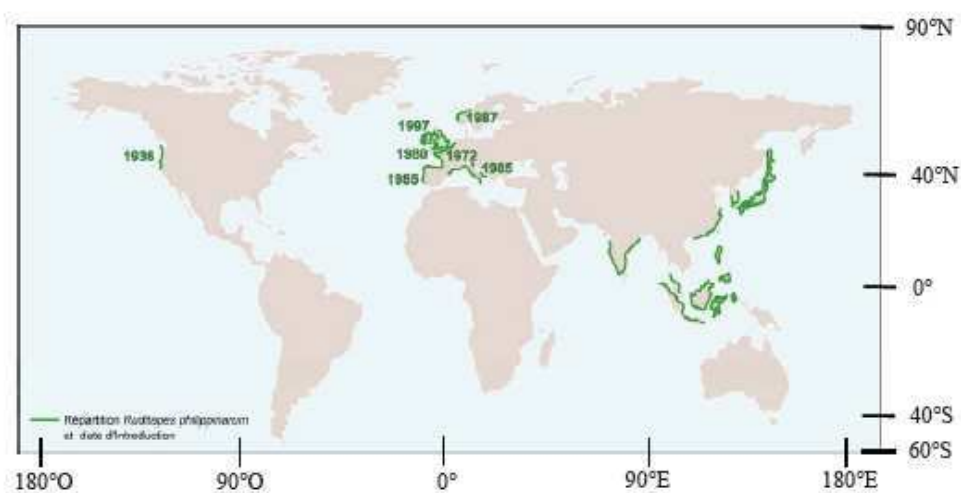


Fig. 6: Aire de répartition mondiale de la palourde japonaise et date d'introduction (Paillard, 2004a).

### 4-3 Biologie de la palourde japonaise

La palourde japonaise est un animal marin benthique fouisseur suspensivore. Son aire de répartition témoigne des fortes variations environnementales qu'elle tolère tant au niveau des températures que des salinités. Elle évolue dans des eaux de 10 à 30°C mais sa température optimale de croissance est comprise entre 20 et 24°C (Gouletquer *et al.*, 1989 ; Solidoro *et al.*, 2000), la salinité est favorable entre 12 ‰ et 32 ‰ (Quero et Vayne, 1998). Elle supporte des salinités quasiment nulles lors d'ondées pendant les basses mers de vives eaux. Elle se trouve dans la zone de l'estran et également en zone subtidale. Le sédiment dans lequel elle vit est variable. Elle est présente dans des vases, graviers vaseux, sables grossiers et sables fins. La palourde japonaise s'enfouie à quelques centimètres de profondeur. Elle se déplace très peu. Lorsqu'elle se déplace de quelques mètres, elle forme des trainées caractéristiques à la surface du sédiment. Lorsqu'elles sont affectées par *V. tapetis*, lors de mortalités hivernales et pré-printanières, elles remontent à la surface du sédiment (Paillard et Maes, 1994).

#### 4-3-1 Anatomie de la palourde (Figures 7 et 8)

Les palourdes sont des animaux à corps mou enfermé dans une coquille à deux valves symétriques. Les valves sont articulées autour d'une charnière dorsale et maintenues par des muscles adducteurs. Les parties molles du corps sont enveloppées dans le manteau qui délimite la cavité palléale.

La palourde japonaise se nourrit par filtration de microphytobenthos, de phytoplanctons et de matières organiques particulaires et détritiques (Flye Sainte-Marie, 2007). Ses siphons (un exhalant et un inhalant) rejoignent la zone d'interface eau-sédiment pour effectuer l'apport de nourriture, la circulation de l'eau de mer et l'excrétion des déchets. Les siphons de la palourde japonaise sont soudés sur la plupart de leur longueur et ne se séparent qu'à quelques millimètres de leur extrémité contrairement à la palourde européenne qui possède deux siphons bien distincts (Quero et Vayne, 1998 ; Flye Sainte Marie, 2007). Le siphon inhalant apporte les particules de l'eau de mer jusqu'aux branchies. Les branchies trient les

particules et les dirigent vers les palpes labiaux avant leur consommation. Les branchies participent à la respiration en diffusant l'oxygène de l'eau de mer. Le système digestif est simple et est composé de la bouche, de l'œsophage, de l'estomac muni d'un stylet cristallin, de la glande digestive, de l'intestin et de l'anus. Le siphon exhalant permet la sortie des déchets mais aussi l'expulsion des gamètes (Jones et Sanford, 1993).

Le pied musculueux sert au déplacement et à l'enfouissement. Il abrite une glande byssogène participant à la fixation de la palourde.

Le système circulatoire est semi-ouvert permettant la libre circulation de l'hémolymphe au sein des tissus. Le cœur est constitué d'un ventricule et de deux oreillettes.

Le système nerveux est composé de trois paires ganglions (cérébraux, pédiéux et viscéraux) et de cordons nerveux innervant le pied, le manteau et la masse viscérale.

Le manteau est l'organe principal participant à la formation de la coquille. Il est constitué de deux lobes et de 4 bourrelets à la périphérie délimitant plusieurs compartiments : les cavités extrapalléales périphérique et centrale contenant les fluides extrapalléaux périphérique et central (Paillard et Le Penec, 1993 ; Allam et Paillard, 1998).

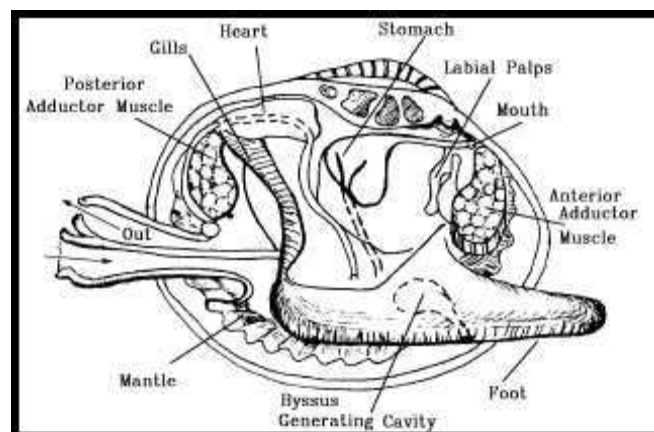


Fig. 7 : Orientation postéro-ventrale de la palourde japonaise (Sandford et Jones, 1993).



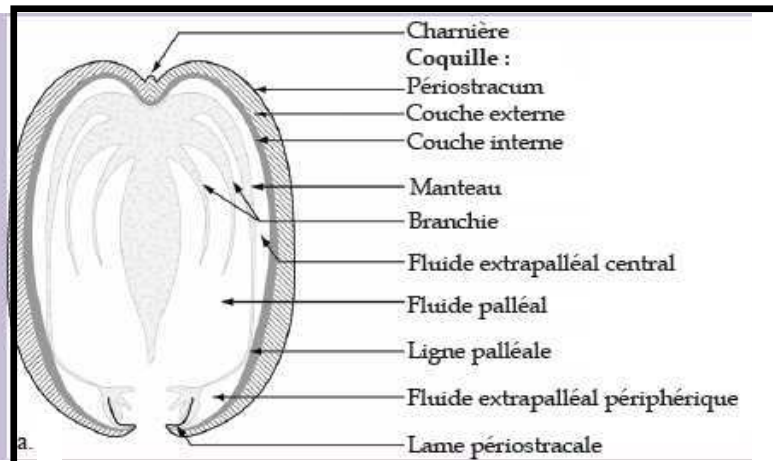


Fig. 8 : Coupe transversale de la palourde japonaise (Trinkler, 2009).

#### 4-3-2 Reproduction et cycle de vie

La palourde japonaise est une espèce gonochorique à fécondation externe. Les gonades forment un tissu diffus autour du tube digestif. En zone tempérée, la gonade se développe au printemps et la maturation dure de 2 à 5 mois sur des palourdes âgées d'au moins 2 ans et de taille minimale de 20mm. L'apport trophique et la température sont deux conditions environnementales clés au développement gonadique (Laruelle, 1999, Park et Choi, 2004). La gamétogenèse s'initie entre 8 et 12°C (Laruelle, 1999 ; Park et Choi, 2004). Quelques individus arrivent à développer leur gonade en dessous de 8°C (Drummond *et al.*, 2006). Une ponte principale se produit en août et septembre (Robert *et al.*, 1993 ; Laruelle, 1999). Des pontes partielles peuvent se produire au printemps et en automne mais elles ne participent pas efficacement aux recrutements. Des pontes tardives peuvent être observées en début d'automne avant le début de la régression des gonades (Gouletquer *et al.*, 1989).

Le cycle de vie de la palourde japonaise est méroplanctonique. La fécondation des gamètes émis et le développement larvaire ont lieu en pleine eau. Les œufs fécondés mesurent 70µm de diamètre (Jones et Sandford, 1993; Pronnier, 1996). Au bout de 24h à 48h, les premières divisions embryonnaires mènent à la formation des larves D ou larves trochophores ciliées (100µm) (Helm et Pelizzato, 1990 ; Jones et Sandford, 1993 ; Calvez, 2003) qui commencent à se nourrir. La vie larvaire planctonique dure de 10 à

15 jours au cours de laquelle un vélum se développe permettant à la larve véligère de nager dans la masse d'eau (Quéro et Vayne, 1998, Jones et Sandford, 1993, Calves, 2003). Par la suite, les larves métamorphosent en larves pédivéligères (200µm) formant un pied. La métamorphose est marquée également par la disparition du vélum, l'apparition de la glande digestive et la minéralisation de la coquille dissiconche (Le Pennec, 1978). Au cours de cette étape du développement larvaire, les larves devenues des juvéniles sédimentent passivement pour commencer leur vie benthique (Jones et Sandford, 1993; Marin *et al.*, 2007). La dispersion des larves dépend des courants marins mais la fixation au substrat apparaît préférentiellement sur des milieux sableux contenant des particules de petites tailles (Jones et Sandford, 1993 ; Calvez, 2003, Flye Sainte-Marie, 2007).

La taille moyenne de commercialisation de la palourde japonaise est située entre 35 à 45mm et sa taille maximale atteint 70mm (Flye Sainte-Marie, 2007) jusqu'à 90mm (spécimen de la Rade de Brest récolté en 2009).

#### 4-4 Production

##### 4-4-1 Productions mondiale et française

La palourde japonaise est avec l'huître *Crassostrea gigas*, la coquille saint Jacques *Pecten maximus*, la moule *Mytilus edulis*, l'amande *Glycymeris glycymeris*, la praire *Venus verrucosa* un bivalve très apprécié pour l'alimentation humaine et en fait un produit de consommation exploité dans le milieu naturel ou par l'aquaculture. Elle est une des espèces les plus produites dans le monde entier grâce à ses bonnes capacités de croissance et à ses tolérances environnementales. En 2007, les productions française et mondiale de la palourde japonaise atteignaient plus de 2.4 millions et 3 milliards de tonnes respectivement comprises entre les productions mondiales annuelles de l'huître *C. gigas* (plus de 4 milliards de tonnes) et de la moule *M. edulis* (289 millions de tonnes) (FAO fisheries statistics [www.fao.org](http://www.fao.org), 2009).

#### 4-4-2 Production en milieu contrôlé

Le rôle des écloséries est de produire des larves et des naissains en quantité importante pour la vénériculture (culture des veneridés). Chaque étape de la reproduction et du développement larvaire est contrôlée. Cette production permet de contrer les pontes estivales de cycle de reproduction naturelle. En réalisant des pontes printanières, la croissance est accélérée en été et en automne aux saisons de blooms phytoplanctoniques. La croissance hivernale est quasiment nulle. Les méthodes d'écloserie permettent d'accélérer le temps de maturation dans des eaux plus chaudes et un régime trophique plus riche et abondant. Pour obtenir un maximum de gamètes, les palourdes utilisées pour les reproductions en écloserie sont âgées entre 3 ans et 5 ans (Jones et Sandford, 1993). L'émission de gamètes est provoquée par des chocs thermiques sur des groupes de géniteurs. Il suffit que peu de mâles pondent pour provoquer une ponte massive de tous les géniteurs mûres.

En milieu contrôlé, la proportion du succès de reproduction jusqu'au stade naissain est beaucoup plus élevée qu'en milieu naturel du fait de la bonne maîtrise de tous les paramètres appliqués. Près de 80% des larves métamorphosent. Les variations de courants marins, salinité, température, apports trophiques et les prédatons sont alors fortement diminuées. Les principales pertes sont dues aux tamisages successifs.

#### 4-5 Cas particulier de la maladie de l'anneau brun

C'est entre le printemps et l'été 1987 que de fortes mortalités de palourdes japonaises juvéniles et adultes ont été observées sur le site vénéricole du Brouënnou dans les Abers du Nord Finistère, premier site d'élevage de palourdes en France à cette période (Paillard et Maes, 1990, Flassch *et al.*, 1992).

Les valves internes des animaux présentaient un symptôme caractéristique : un dépôt de couleur brune à l'origine du nom de la maladie de l'anneau brun (Paillard *et al.*, 1989) (Fig. 9). La maladie s'est étendue rapidement sur les côtes Atlantiques françaises et les symptômes ont été relevés en 1988 dans le bassin de Marennes Oléron (Gouletquer, 1989) et en 1989 dans le bassin

d’Arcachon (Robert et Deitreil, 1990). La maladie a progressé par la suite en 1993 en Espagne et en Italie, en 1997 en Grande Bretagne, en 1998 en Irlande, en 2000 en Tunisie et en 2003 en Norvège et Corée du Sud (Paillard, 2004a, b).

La présence du dépôt brun a été répertoriée chez plusieurs Vénéridés : *R. philippinarum*, *R. decussatus*, *Venerupis aurea* et *Tapes rhomboides* (Paillard, 2004a).



Fig. 9 : Photo de palourde vidée présentant un anneau brun. Echelle=1cm.

#### 4-5-1 L’agent pathogène de la maladie

L’agent responsable de la MAB est une bactérie du genre *Vibrio* isolée en 1990. Cette bactérie a d’abord été mentionnée *Vibrio* Prédominant 1 (VP1) avant d’être nommée *V. tapetis* (Paillard et Maes, 1990; Borrego *et al.*, 1996). *V. tapetis* appartient au Phylum des Proteobactéries (Stackebrandt *et al.*, 1986), de la Classe des Gammaproteobacteries, de l’Ordre des Vibrionales et de la Famille des Vibrionacées (Véron, 1965) (Fig. 10). De nombreuses souches ont été répertoriées depuis l’apparition de la maladie et la souche CECT 4600 ou CIP 104856, isolée en 1990 lors de fortes mortalités à Landéda dans le Nord Finistère, reste la souche la plus pathogène de *R. philippinarum* (Choquet *et al.*, 2003).

Le *V. tapetis* a été isolé dans différentes zones de l'Europe à partir de bivalves (*R. philippinarum*, *R. decussatus*, *T. rhomboïdes*, *V. Aurea* (Paillard, 2004a)) ou de poissons comme la vieille *Symphodus melops* en Norvège (Jensen *et al.*, 2003), le flétan d'Atlantique *Hyppoglossus hypoglossus* en Ecosse (Reid *et al.*, 2003) et dernièrement la sole *Dicologlossa cuneata* en Espagne (López *et al.*, 2011). *V. tapetis* se répartit dans des aires à températures marines variables. En effet, il est présent principalement sur les côtes atlantiques européennes de l'Angleterre à la Galice mais également en mer du Nord (Reid *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2003) et en Corée (Park *et al.*, 2006). Ce vibrio n'implique pas de pathogénicité chez tous ses hôtes. En Irlande, alors que *V. tapetis* est détecté dans les palourdes *R. philippinarum*, celles-ci ne montrent pas systématiquement de fortes susceptibilités sur le terrain. Par contre, suite à une exposition à *V. tapetis* en laboratoire, les palourdes d'Irlande atteignent une prévalence de la MAB de 50% (Drummond *et al.*, 2007).

Le moyen de détection de *V. tapetis* au sein de populations de culture n'est pas encore au point malgré diverses techniques de diagnostic telles que les tests d'agglutination et l'amplification par PCR d'une séquence 16S (Paillard *et al.*, 2006 ; Drummond *et al.*, 2006b). Très récemment, Balboa et ses collaborateurs (2011) ont déterminé de nouvelles amorces plus spécifiques. L'annotation du génome complet de *V. tapetis* (projet Vibroscope (Resp. D. Mazel, Institut Pasteur et F. Leroux, Ifremer) du Genoscope) va bientôt permettre de développer des détections par amplification de séquences d'ADN plus spécifiques à la bactérie provenant de leur hôte ou de leur milieu. *V. tapetis* connaît un large spectre de températures de croissance mais sa température optimale en milieu contrôlé est de 18°C et sa mortalité apparaît au dessus de 27 °C (Maes, 1992, Haberkorn, 2005).

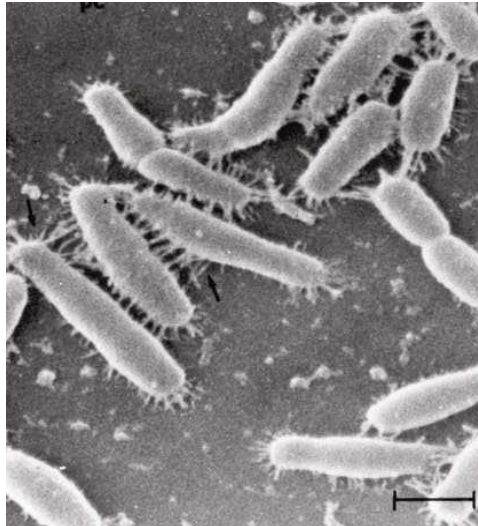


Fig.10: Photo en microscopie électronique à balayage de bactéries *Vibrio tapetis*.adhérentes au périostacum de la palourde. Echelle=1 $\mu$ m. (Paillard, 2004a)

#### 4-5-2 Colonisation de la bactérie et formation de l'anneau brun

Au cours de l'infection de la palourde, *V. tapetis* s'infiltré dans la cavité palléale ou par les siphons puis adhère à la lame périostacale par l'utilisation de pilis provoquant des altérations de la couche organique du périostacum et des matrices organiques coquillères. La colonisation s'étend sur le bord du manteau, vers les tissus et dans les fluides extrapalléaux et peut atteindre l'hémolymphe via des lésions de tissus (Paillard, 2004b). Au niveau de la surface interne du bord de la coquille, une production de matière organique de couleur brune appelée conchyoline recouvre la zone colonisée par les bactéries. La conchyoline est mélanisée (Paillard, 1992) et présente une composition biochimique différente de celle de la matrice coquillière (Gouletquer *et al.*, 1989).

La MAB comporte différents stades de développement caractérisés par l'intensité du dépôt brun (Fig.11). Une méthode de diagnostic distinguant des stades de l'étendue du recouvrement de la coquille interne par le dépôt brun a été déterminée par Paillard et Maes en 1994. Les stades (Conchyoline Deposit Stage (CDS)) les moins avancés sont caractérisés par des dépôts en petites tâches microscopiques nécessitant l'utilisation d'une loupe binoculaire. Plus les dépôts bruns s'étendent et s'épaississent plus les stades

augmentent. Au stade le plus avancé, l'ensemble de la coquille interne est envahi par le dépôt brun macroscopique.

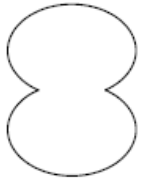
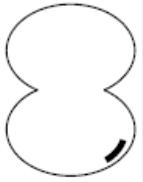
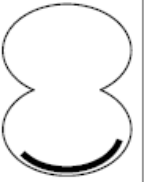



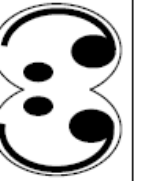
CDS	1	2	3	4	5	6	7
Symptômes							
	microscopique	visible à l'oeil nu					

Fig. 11 : Echelle de classification des symptômes de la Maladie de l'Anneau Brun représentée en stade de développement du dépôt de conchyoline (CDS) (d'après Paillard et Maes, 1994).

#### 4-5-3 Physiologie de la palourde face à la MAB

Un déséquilibre physiologique relie la production de conchyoline à une diminution de l'indice de condition et du taux de croissance des animaux (Flye Sainte-Marie *et al.*, 2007a, 2009b ; Paillard, 1992). A un stade avancé de la MAB, le taux de respiration et le taux de filtration baissent (Flye Sainte-Marie, 2007). Cependant, la prévalence de la maladie est corrélée avec la granulométrie du milieu et la taille de la coquille en milieu naturel (Flye Sainte-Marie *et al.*, 2008). En milieu expérimental, l'agent pathogène directement au contact de l'hémolymphe ou des tissus de l'animal entraîne une mortalité en quelques jours correspondant à une hémocytose (Allam *et al.*, 2000a, 2002 ; Paillard *et al.*, 2004).

Le nombre d'hémocytes total augmente avec le développement de la MAB (Oubella *et al.*, 1996, Allam *et al.*, 2000a). De plus, Allam et collaborateurs (2001) ont montré un pourcentage de granulocytes du fluide extrapalléal inversement corrélé au développement de la MAB. Par contre, une population naturelle du Golfe du Morbihan présentant de faibles CDS n'a pas permis de relier les quantités des hémocytes totaux et le pourcentage de granulocytes avec le développement de la MAB (Flye Sainte-Marie *et al.*, 2009a).

La MAB touche les juvéniles et les adultes mais son développement semble être corrélé positivement avec la taille des individus. Par contre, la MAB n'a pas été observée sur les larves.

#### 4-5-4 Moyens de défense chez *R. philippinarum*

De par la caractéristique de réparation coquillière, plusieurs stades de réparation sont observables sur les zones de dépôts de conchyoline (Paillard et Maes, 1994, Paillard, 2004). Ce processus consiste en une lutte contre l'agent pathogène en l'enrobant dans des couches de périostracum et conchyoline. La mort n'apparaît n'entraîne la mort qu'à des CDS avancés correspondant aussi à un amaigrissement de la chair (Fig. 12). D'autre part, l'injection du *V. tapetis* dans les muscles adducteurs provoque une septicémie rapide (Allam *et al.*, 2002, Paillard *et al.*, 2004). Les animaux pourraient avoir deux ressources de défense plus efficaces dès le début de l'infection par le *V. tapetis* en empêchant sa prolifération: 1) pas de développement de la maladie par interception et élimination rapide du pathogène et 2) réparation totale suite à l'encapsulation des bactéries au niveau du dépôt brun. Dans une population étudiée sur plusieurs générations une proportion plus élevée de palourdes à faible CDS est corrélée à des stades de réparations plus avancés ou de réparation totale (Trinkler *et al.*, 2010).

Par ailleurs, des inoculations de *V. tapetis* dans la cavité palléale des palourdes japonaises ont montré des augmentations de la concentration totale en hémocytes ainsi qu'une augmentation en granulocytes et une diminution en hyalinocytes à partir d'une concentration seuil de  $5 \cdot 10^6$  bactéries/palourde (Oubella *et al.*, 1993, 1994 et 1996).

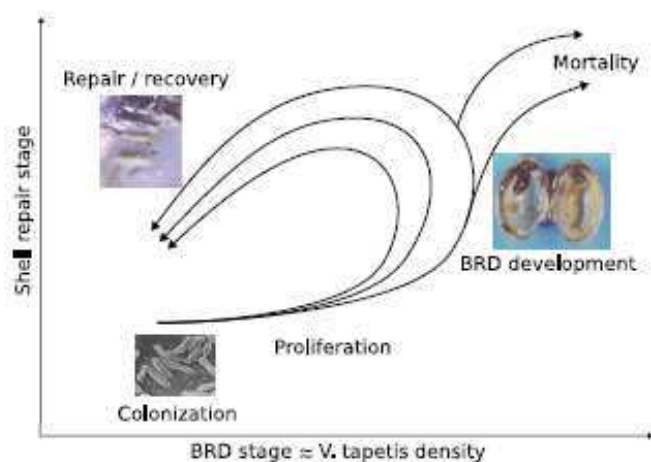


Fig. 12 : Schéma conceptuel du développement de la MAB à l'échelle individuelle illustré par différentes trajectoires individuelles possibles dans un plan stade de réparation / stade de maladie (Flye Sainte-Marie, 2007, d'après Paillard, 2004a).



#### 4-5-5 Signe de résistance à la MAB

Au cours de l'année 2000, une population aquacole cultivée dans différents sites de culture le long de la côte française (Chausey, rade de Brest, Golfe du Morbihan et Marennes) n'a montré qu'un très faible taux de prévalence de la MAB (3% au maximum) (Soudant *et al*, 2004).

Les études sur la sélection de populations montrant une résistance à des maladies dues à des pathogènes (essentiellement effectuées sur des espèces ostréicoles) a incité la mise en œuvre d'études de résistance à la MAB sur la palourde japonaise. Ainsi, depuis l'année 2000, plusieurs générations ont été sélectionnées à partir de la population aquacole de faible prévalence.

La deuxième génération (appelée population R) montrait encore un taux de prévalence moindre et une réparation coquillière supérieure par rapport à une population standard suite à une inoculation de *V. tapetis* (Trinkler *et al*, 2010). Par la suite, l'hypothèse d'une forme de résistance à la MAB sur la population R a été soulevée.

#### Conclusion

Le développement de la maladie peut donc être enrayé par des processus immunitaires d'efficacité variable entre les individus.

Le polymorphisme génétique permet aux animaux d'une même espèce de lutter différemment contre des agressions bactériennes. L'implication de différents niveaux d'expression de gènes spécifiques dans les mécanismes de l'immunité peut être une source de formes de résistance à des maladies. Les études préalablement effectuées sur la maladie de l'anneau brun doivent être exploitées pour approfondir nos connaissances sur les capacités de résistance des palourdes japonaises. Le travail de thèse s'est axé sur des sélections de géniteurs provenant de la population R et de population standard suivant des critères physiologiques et sur la production de familles à partir de géniteurs à sensibilité différentielle face à la MAB.

## **Chapitre 2 :**

### **Matériels et méthodes**



## 1- Sélection de géniteurs

### 1-1 Provenance des sites de cultures

Les géniteurs testés au cours de la thèse ont été récoltés sur trois principaux sites : Landéda, les Iles Chausey et Ile Tudy.

Landéda est le lieu de l'explosion de la maladie de l'anneau brun à fortes mortalités à la fin des années 80. Le substrat y est sableux vaseux. La facilité d'accès du site permet de récolter les palourdes de nombreux jours dans l'année lors des coefficients de marée supérieurs à 75.

Les bancs de sable des Iles Chausey sont exploités essentiellement pour la culture de la palourde. C'est un des sites vénéricoles le plus productif du Nord de la France. La mortalité des palourdes y est très faible. Le site est majoritairement sableux. L'accès ne peut se faire que par bateau en partant de Granville et pour des coefficients de marée supérieur à 90.

Récemment, l'étang de l'Ile Tudy est redevenu un site de culture de palourdes après de longues années de suspens. Le substrat est sableux vaseux. Du fait du stockage en étang, les animaux ne subissent pas autant d'émersion que dans les deux sites précédents. L'accès à l'étang pour nos récoltes nécessite d'ouvrir les vannes afin de vider l'eau.

### 1-2 Lot de production des géniteurs.

Les géniteurs proviennent des productions de la SATMAR. Les géniteurs proviennent des 7<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> pontes de l'année 2006 pour les animaux provenant de Landéda nommée PJ-06-7 et PJ-06-10. La population PJ-06-10 est issue d'une série de générations appartenant à une population montrant une faible sensibilité face à la MAB par rapport aux populations davantage susceptibles comme la population PJ-06-7 dit lot Standard « S ». Les animaux provenant de Chausey sont issus d'un autre lot Standard nommé PJ-08-9 (voir Tab.2).

Les sites de provenance, les noms des lots et les années de productions, la susceptibilité face à la maladie de l'anneau brun et l'âge des géniteurs utilisés lors des expérimentations sont détaillées dans le tableau 2.

Tab.2: Caractéristique des géniteurs utilisés pour les expérimentations. Lot PJ-06-10 considéré comme résistants et lot PJ-06-7 et PJ-06-9 considérés comme sensibles.

Site de provenance	Lot de géniteurs	Année de production	Susceptibilité face à la MAB	Age pour les sélections
Landéda	PJ-06-7	2006	Forte	19 mois et 35 mois
	PJ-06-10		Faible	20 mois et 35 mois
Chausey	PJ-06-9	2006	Forte	27 mois
	PJ-06-10		Faible	
Ile Tudy	Non déterminé	2007	Non déterminée	Entre 24mois et 36mois

## 2- Juvéniles de la première génération

### 2-1 Pontes et stades larvaires

Les pontes se réalisent à la station SATMAR de Leucate en Méditerranée. Les températures de l'eau sont plus élevées que dans l'Atlantique et dans la Manche et sont plus appropriées aux pontes. La maturation des géniteurs est réalisée dans des clayettes dans une eau à 19°C avec un apport nutritif constant c'est à dire par les microalgues (*Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis* et *Isochrysis galbana* (T. Iso)) produites directement sur le site de l'écloserie de la SATMAR de Leucate.

Le contrôle de la maturité des géniteurs est réalisé régulièrement en incisant la gonade d'un géniteur. Lorsque la maturité semble à terme, la ponte est provoquée par choc thermique sur des géniteurs matures. Les géniteurs sont alors placés dans la table de ponte (Fig. 13) dans une eau à 26°C pendant 20 minutes puis dans une eau à 19°C pendant 20 minutes. Quelques cycles de température induisent la ponte des géniteurs.

Lorsqu'un géniteur pond, il est immédiatement placé dans un bécher de 2 litres contenant une eau de mer à 25°C afin d'isoler sa semence. Quelques gouttes sont prélevées et observées au microscope optique pour déterminer le sexe du géniteur.

Les mâles produisent suffisamment de gamètes pour féconder plusieurs femelles. Nous avons procédé au croisement de 1 mâle pour 3 femelles. La semence du mâle est ensuite répartie dans chacun des béchers contenant des ovocytes. A cette étape, chaque famille est donc isolée dans un bécher de 2 litres.

L'évolution du développement larvaire (stades morula) est suivie par prélèvement régulier de l'eau du bécher. Les larves sont observées avec un microscope et mesurée grâce à une lentille graduée. Arrivée au stade D, les familles sont transférées dans un bac commun de 350 litres à une eau de 25°C (Fig. 14). Les larves ne sont pas nourries le premier jour. Le deuxième jour, les larves sont nourries avec un mélange de phytoplancton (*Chaetoceros pumillum* et *C. isochoisis*) deux fois par jour jusqu'au 4<sup>e</sup> jour après la fécondation (J4). A J4, un premier nettoyage se fait en triant les larves dans un tamis de 75µm et récupérées dans un tamis de 30µm. Une estimation de la quantité de larves se fait par comptage après récupération des larves tamis dans un bécher de 5 litres. Puis, les larves sont rediluées dans un grand bac de 350L d'eau de mer à 27°C. L'alimentation est en suite enrichie par l'ajout de *Chaetoceros gracilis*. A J8, les larves passent en tamis de 160µm et récupérées dans un tamis de 43µm, comptées puis remises en bac en eau à 27°C. Enfin à J11, les larves développent un pied et deviennent pédivéligères. Elles sont tamisées sur un diamètre de 160µm.

Les larves supérieures à 160µm sont alors envoyées à la station SATMAR de Bouin où aura lieu la métamorphose et les larves inférieures à 160µm sont gardées 2 jours supplémentaires puis envoyées à Bouin où elles continueront à se développer. Elles seront envoyées à Marennes pour le stade de fixation et y séjourneront jusqu'à la période des semis (à une taille proche de 10mm).

Quatre familles puis trois familles ont été produites lors de la première de la première année.

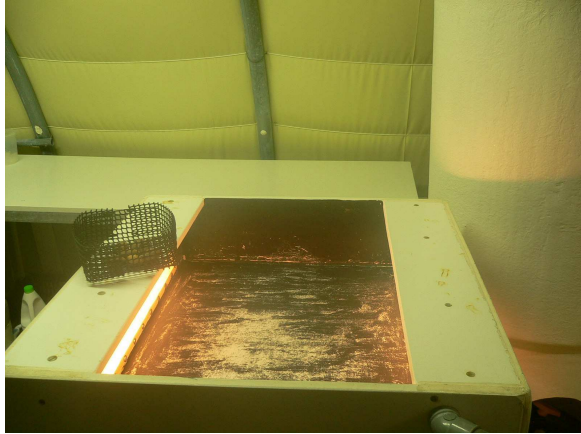


Fig. 13 : Photo de la table de pont pouvant accueillir une soixantaine de géniteurs.



Fig. 14: Bacs de 350 litres pour les développements larvaires du stade D au stade pédivéligère.

## 2-2 Semi sur trois sites

Les juvéniles ont été envoyés en deux lots PJ-08-R1 et PJ-08-R2 pour le semis sur trois sites du Finistère : un semis à Landéda lieu d'apparition de la maladie de l'anneau brun, un second semis à Carantec en Baie de Morlaix où de nombreuses palourdes sauvages nichent et un troisième semis dans l'étang de l'île Tudy où la maladie n'a pas encore été répertoriée (Fig. 15). Les sites de l'île Tudy et de Landéda sont les mêmes que ceux des géniteurs.

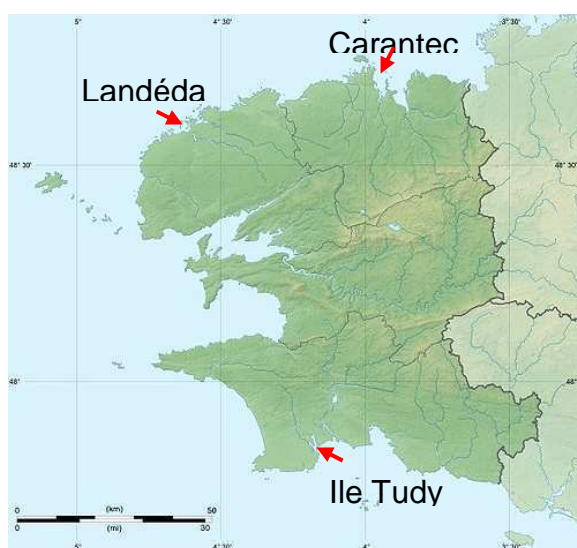


Fig. 15 : Sites des semis dans le Finistère des familles des deux lots PJ-08-R1 et PJ-08-R2.

### 3- Mesures de la taille des animaux

La taille des géniteurs et le suivi de la croissance des juvéniles sont déterminés par la mesure de la longueur antéro-postérieure maximale de la coquille avec un pied à coulisse électronique Digital Caliper (0-300mm).

### 4- Diagnostic du développement du dépôt de conchyoline et de la réparation coquillière.

Le diagnostic de la MAB est réalisé par l'utilisation de la classification des symptômes décrit par Paillard et Maes, 1994 (Fig. 11 chapitre 1 p.56). Il consiste en l'observation des faces internes des valves permettant de distinguer 7 stades de développement de conchyoline. Le premier stade, le moins avancé de la maladie, correspond à de petites tâches microscopiques non visibles à l'œil nu, observable à l'aide d'une loupe binoculaire. Les stades augmentent suivant l'extension des dépôts de conchyoline.

Pour l'étude de la MAB sur les juvéniles, le faible nombre d'individus par famille a mené au regroupement des stades en quatre groupes de M0 à M3 tels que :



- M0 : Animaux asymptomatiques (nommés « sains »)
- M1 : Stades CDS 1 et CDS 2
- M2 : Stades CDS 3 et CDS 4
- M3 : Stades CDS 5 à CDS 7

Le second classement concerne la guérison qui est un recouvrement plus ou moins étendu du dépôt brun par une nouvelle couche calcifiée (Paillard et Maes, 1994, Paillard, 2004a). Le stade RAB 0 correspond aux palourdes malades n'ayant pas commencé le processus de réparation. Puis, le stade RAB 1 est représenté par le recouvrement du dépôt brun en petits amas calcifiés indiquant le début du processus de réparation. L'extension en plaque du recouvrement calcifié correspond au stade RAB 2 de réparation coquillière. La quasi-totalité du dépôt brun recouvert par la plaque calcifiée est considéré comme le stade RAB 2.5. Enfin, lorsque la plaque recouvre complètement le dépôt brun, le stade correspond au RAB 3.

Pour la détermination de la prévalence, les animaux ont été entièrement vidés avant l'observation à la loupe binoculaire. Par contre, lors des sélections de géniteurs, le diagnostic des RAB a été effectué sur des animaux anesthésiés. Les palourdes sont anesthésiées par immersion dans un mélange 3/5 eau douce et 2/5 eau de mer contenant 5% de  $MgCl_2$ .

La prévalence déterminée au cours du suivi des familles produites n'a pas été détaillée par stades.

## 5- Inoculation bactérienne

### 5-1 Suspension de *Vibrio tapetis*

La souche utilisée au cours de la thèse est nommée CECT 4600. Cette souche provient du site de Landéda isolée dans les années 1980.

Elle est mise en culture 72h avant les expérimentations sur milieu solide Zobell puis mise en suspension dans de l'eau de mer stérile filtrée. La concentration est mesurée par spectromètre à 490nm.

## 5-2 Inoculation

Les palourdes, préalablement sortis de l'eau la veille de l'inoculation pour inciter l'ouverture suffisante des valves, sont immergées dans une fine couche d'eau de mer et sont injectées de 100µl de solution bactérienne à  $10^8$  b.ml<sup>-1</sup>. Les palourdes inoculées restent quelques heures à sec puis remises en eau de mer tout au long de l'incubation de 4 à 6 semaines selon les expériences.

## 6- Mesures des paramètres hématocytaires

### 6-1 Concentration hématocytaire totale (THC) et viabilité

La THC et la viabilité cellulaire des hémocytes de l'hémolymphe sont obtenues en même temps par mesure au cytomètre Guava. Cinquante microlitres d'hémolymphe, filtrée sur 80µm lors du prélèvement, sont déposés dans un puits de plaque de culture 96 puits. Cent cinquante microlitres de Viacount (SybrGreen et de l'iodure de Propidium) sont ajoutés à l'hémolymphe. L'iodure de Propidium diffuse uniquement dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire et donc considérées mortes. Le SybrGreen diffuse dans l'ensemble des cellules mortes et vivantes. Après 5 minutes d'incubation, les mesures de fluorescence à des longueurs d'onde de 500-530nm dans le vert et de 550-600nm dans l'orange permettent d'obtenir les cytogrammes analysés par le logiciel Cytosoft 5.0.2 (Fig.16). La concentration totale en hémocytes viables est exprimée en cellules.ml<sup>-1</sup> et la viabilité en pourcentage de cellules vivantes.

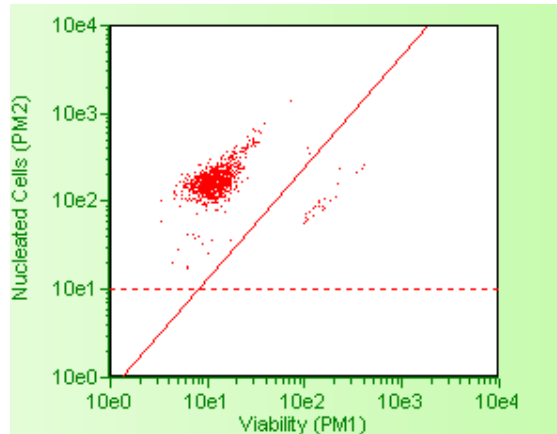


Fig. 16 : Exemple de cytogramme de la concentration et la viabilité cellulaire de l'hémolymphe. THC=  $1.6 \cdot 10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$  et Viabilité = 97.6%.

## 6-2 Test adhérence couplé au dosage d'oxyde nitrique

### 6-2-1 Mesure de l'adhérence

Le test d'adhérence consiste en une comparaison du pourcentage de cellules non adhérees (CNA) après un contact avec une solution de *V. tapetis* ou restée dans l'eau de mer stérile filtrée (EMSF) dans des puits de plaque de culture cellulaire. Ce test a été mis au point par Choquet et al (2003).

Sur glace, 100µl d'hémolymphe sont déposés dans un puits auxquels sont ajoutés 100µl d'EMSF. Après 30 minutes, les puits reçoivent soit 200µl d'EMSF soit un mélange de 100µl d'EMSF et de 100µl de suspension bactérienne avec un ratio bactéries:hémocyte estimé à 25.

Les plaques de culture sont incubées pendant 3h dans une étuve à 18°C. Au terme de l'incubation, 50µl du surnageant des puits sont prélevés en duplicat pour le dosage de l'Oxyde Nitrique (voir section 6-2-2).

Trois cent microlitres de formol 6% sont ajoutés dans chaque puits pour fixer les cellules.

Les plaques ont été stockées à 4°C jusqu'au lendemain pour l'analyse au cytomètre.

4µl de SybrGreen à  $10^{-2}$  (solution commerciale 10 000X) sont déposés dans chaque puits. Après une incubation de 30 minutes, les échantillons sont passés au cytomètre Guava.

Ainsi trois biomarqueurs sont obtenus par cette analyse :

-Adhérence cellulaire après 3 heures dans l'eau de mer stérile filtrée EMSF,

-Adhérence cellulaire après un contact de 3h avec *V. tapetis*

-Ratio de l'adhérence calculé par la formule suivante :

$$Ratio = \frac{\% \text{ cellules non adhérees } V. \text{ tapetis}}{\% \text{ cellules non adhérees EMSF}}$$

### 6-2-2 Dosage de l'oxyde nitrique

La méthode la plus rapide et la moins coûteuse de mesure indirecte du NO est celle de la réaction de Griess. Le dosage du NO est effectué sur le surnageant du test d'adhérence. Du fait de la courte demi-vie du NO, son dosage est effectué par méthode indirecte sur la concentration des métabolites stables du NO (nitrates et nitrites) par spectrophotométrie.

Cinquante microlitres de surnageant sont déposés dans un puits de microplaque 96 puits auxquels sont ajoutés successivement après une incubation de 10 minutes 50 µl de sulfanilamide 1% puis 50µl de NED 0.1%. Après une seconde incubation de 10 minutes, les réactions colorimétriques de couleurs rosées à pourpres selon la concentration en nitrites sont mesurées avec un spectromètre Multiskan à 540nm. Les concentrations de NO sont déterminées à partir d'une gamme standard de Nitrite de Sodium.

### 6-3 Activité de phagocytose

Cent microlitres d'hémolymphe sont dilués avec 100µl d'EMSF auxquels sont ajoutés 30µl d'une suspension de billes fluorescentes de 2 µm commerciale diluée au cinquantième. Le mélange incube pendant 2 heures à 18°C à l'obscurité avant d'être analysé à 500-530nm dans un cytomètre à flux FACS-Calibur (Becton Dickinson). Les hémocytes contenant les billes fluorescentes sont détectés. Le pourcentage d'hémocytes phagocytaire est déterminé par le

pourcentage d'hémocytes qui englobent trois billes et plus (Delaporte *et al.*, 2003).

#### 6-4 Mesures des Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont mesurées par la réaction avec le 2',7'- dichloro fluorescein diacetate (DCFDA). Cent microlitres d'hémolymphe sont dilués soit dans 300µL d'EMSF pour les hémolymphe contrôles, soit dans 200µL d'EMSF et 100µl de suspension bactérienne pour les hémocytes en contact avec le *V. tapetis* (ratio bactéries:hémocytes 25). Quatre microlitres de DCFDA (0.1 mM) sont ajoutés et l'ensemble est incubé 2 heures à 18°C à l'obscurité. Le DCF fluorescent obtenu par la présence des ROS permet de quantifier la production des ROS au cytomètre en flux FACS-Calibur (Becton Dickinson) (Lambert *et al.*, 2003).

#### 6-5 Dosage des protéines

La concentration en protéines de l'hémolymphe (ou plasma et hémocytes) est effectuée par le kit Biorad Protein Assay. Dix microlitres d'échantillon sont dilués dans 190µl de réactif. Après une incubation de 30 minutes les protéines sont mesurées à 595nm sur un spectromètre Multiskan. Les concentrations sont déterminées à partir d'une gamme standard d'albumine de sérum bovin (BSA).

#### 6-6 Activité phénoloxydase

Cent microlitres d'hémolymphe sont centrifugés 3 minutes à 500g afin de séparer le plasma des hémocytes. Le plasma est déposé dans un puits de microplaque. Les hémocytes sont ensuite dilués dans 100µl d'EMSF et congelés/décongelés trois fois de suite pendant 30 minutes. L'activité phénoloxydase est décrite dans les travaux de Reid *et al* (2003). Elle consiste en une mesure colorimétrique qui s'intensifie au cours du temps. Cinquante microlitres de Tris HCl (0.2M, pH8) et 100µl de L-3,4-DihydroxyPhénylAlanine (L-DOPA 20mM) filtrés sont ajoutés à chaque puits. La plaque est mise

rapidement sous agitation puis l'activité est mesurée à température ambiante toutes les 2 minutes à 492nm pendant deux heures par un spectromètre POLARstar Omega (BMG Labtech). Des puits contrôles sans hémocytes ni plasma mais contenant du Tris HCl et du L-DOPA sont analysés en parallèle. Les données obtenues sur les puits contrôles sont soustraits des données des puits contenant les échantillons.

## 7- Analyses microsatellites

Pour les géniteurs comme pour les juvéniles, les génotypes de microsatellites sont déterminés après une extraction de l'ADN, une amplification fluorescente de plusieurs loci et enfin la longueur en nombre de paires de bases de l'amplicon par migration dans un séquenceur.

### 7-1 Extraction de l'ADN

L'ADN est issu du manteau pour la première expérimentation de sélection de géniteurs puis de l'hémolymphe pour toutes les autres analyses.

L'ADN est extrait suivant le protocole du kit DNeasy tissu extraction kit (Qiagen).

Les extraits d'ADN sont dilués au dixième avant l'amplification.

### 7-2 Amplification par PCR

Les amorces utilisées pour les PCR de microsatellites découlent des travaux de Yasuda et al (2007) (Tab. 3). Les amorces Forward sont marquées par une molécule fluorescente TAMRA.

Les conditions des amplifications de séquences sont décrites dans le chapitre 5 p.154. Neuf microsatellites ont été préalablement testés sur quelques individus provenant de la rade de Brest et six ont été utilisés au cours de l'étude. Ces loci sont nommés « Asari » qui signifie palourde en japonais.

Tab. 3 : Amorces des 6 microsatellites de *R. philippinarum* (Yasuda *et al.*, 2007)

<i>Locus</i>		<i>5'-3'</i>	<i>Tm</i>
<b>Asari 16</b>	F	GCTCGAGTCTGATTGGCTACTTGAA	55
	R	GGTATCTAGTCAGCTCTTG CAGTA	
<b>Asari 24</b>	F	CCTACGACATGTGGGTTATTT	55
	R	TGTTTTACCTGTCCATCATTCA	
<b>Asari 54</b>	F	TCTTAGCCCAATTTTAGCGAAAAGC	55
	R	AACGTCTTTTAATCATGGATGTGAA	
<b>Asari 55</b>	F	TGGCTTTGTCAATTGTGATTGTG	55
	R	GACAAATTGGCTTTATTTGGAGG	
<b>Asari 62</b>	F	AGTTGTACAGCAGCTCAGCAT	55
	R	CAAATAACTAACATTTTCAGACTGC	
<b>Asari 64</b>	F	GTATCTGAATGGGTTGTTATTGTGAA	55
	R	GCAAATCATTTTCGTTTGATGC	

### 7-3 Electrophorèse

La taille en paires de bases des produits amplifiés est déterminée par migration dans un gel polymère POP7 par le séquenceur Applied Biosystems 3130. La fluorescence de l'amorce Forward marquée est détectée. Le marqueur de taille migrant avec chaque échantillon est le LIZ500. La déterminatin de chaque allèle est effectué grâce au logiciel GeneMapper (Applied Biosystems). Un échantillon control est systématiquement analysé à chaque nouvelle analyse.

Six microsatellites ont été sélectionnés pour la suite des génotypages. Des analyses de diversité allélique, d'hétérozygotie, ont été réalisées sur les résultats obtenus sur les différentes populations. Les Fis, Fst et hétérozygoties ont été mesurés par les logiciels Genetix et Genepop.

### 8- Hybridation soustractive suppressive (SSH)

La technique de la SSH est détaillée dans le chapitre 7. Ce chapitre traite de la SSH effectuée sur le manteau de palourdes de la rade de Brest (indemne de la MAB) inoculées puis incubées avec le *V. tapetis* en laboratoire. Une précédente SSH a été produite sur les hémocytes ayant été incubés *in vitro* par le *V. tapetis*.

Pour l'expérimentation de la SSH, le site de récolte est l'anse de Lanveur en Rade de Brest.

## 9- Mesure de la transcription de gènes

La mesure de l'expression de transcrits a été réalisée par la technique de PCR quantitative relative à un gène de référence selon la méthode décrite dans le chapitre 7.

Les expressions des transcrits sont normalisées par le gène de référence facteur d'élongation (EF) ( $2.9\% < CV < 3.5\%$ ) et sont relatives par rapport à un échantillon contrôle analysé sur chaque plaque de PCR.

## 10- Analyses statistiques

Les tests de normalités ont été effectués par le test de Kolmogorov Smirnov. Le test paramétrique a été utilisé lorsque les séries respectaient une distribution normale. Dans le cas contraire, le test non paramétrique était utilisé. Certaines données exprimées en pourcentage ont été transformées en log avant l'analyse statistique. La comparaison de deux séries données a été effectuée par un test T pour les données paramétriques et un test U pour les données non paramétriques. La comparaison de séries de données comprenant plusieurs variables ont été effectuées par des méthodes d'analyse de variance (ANOVA) et d'analyses multivariées. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Statgraphics Plus. Les valeurs de  $p < 0.05$  considèrent les différences significatives.





**Chapitre 3:**  
**Induction de l'Oxyde Nitrique par les hémocytes**  
**de la palourde japonaise *Ruditapes***  
***philippinarum* après un contact avec *Vibrio***  
***tapetis*.**



## Introduction

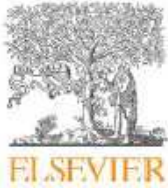
La palourde japonaise principale hôte du *Vibrio tapetis*, responsable de la Maladie de l'Anneau Brun, doit faire face à l'attaque de la bactérie par différents processus. Chez les vertébrés et les invertébrés, l'oxyde nitrique (NO) est produit par les cellules de l'immunité et a la propriété d'être très toxique pour les bactéries, les virus et les parasites.

Le but de ce chapitre est d'évaluer l'effet de *V. tapetis* sur la production de NO de l'hémolymphe des palourdes.

Pour ce faire, des volumes d'hémolymphe et de fluide extrapalléal ont mis en contact avec des suspensions de *V. tapetis* sur plusieurs temps d'incubation. La concentration de l'oxyde nitrique est plus élevée dans l'hémolymphe que dans le fluide extrapalléal à un ratio bactéries:hémocyte 200. La capacité d'adhérence des hémocytes et la production de l'oxyde nitrique peuvent être analysées simultanément sur un même échantillon. Ceci a permis de montrer, après l'ajout d'un inhibiteur de la Nitrique Oxyde Synthase, que le NO semble être produit par les hémocytes adhérents. La présence de l'inhibiteur induit une baisse de la concentration de NO mais induit en plus une diminution du pourcentage de cellules adhérentes lorsque celles-ci sont en contact avec le *V. tapetis*.

L'analyse de la concentration de NO dans l'hémolymphe est un outil pour l'estimation de l'état de santé des palourdes. Ainsi, une forte concentration de NO à l'état basal, c'est-à-dire sur des hémolymphe n'ayant pas subi de contamination bactérienne, indiquerait à un état de santé dégradé.

Cette étude est présentée dans l'article suivant : Jeffroy et Paillard, 2011.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Fish &amp; Shellfish Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fsi](http://www.elsevier.com/locate/fsi)

## Involvement of nitric oxide in the *in vitro* interaction between Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, hemocytes and the bacterium *Vibrio tapetis*

Fanny Jeffroy\*, Christine Paillard

IUEM, UMR CNRS 6539, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 June 2011

Received in revised form

15 September 2011

Accepted 4 October 2011

Available online 14 October 2011

## Keywords:

Nitric oxide

*Ruditapes philippinarum**Vibrio tapetis*

Cell rounding

Pseudopods

## ABSTRACT

The Manila clam, *Ruditapes philippinarum* can become infected by the bacterium *Vibrio tapetis* which causing the Brown Ring Disease along North European Atlantic coasts. Variations in clam immune parameters have been reported in clam challenged with *V. tapetis* but no studies have been done on Nitric Oxide (NO) production. NO is a toxic agent to pathogens produced mostly by immune cells such as hemocytes in invertebrates. In this study, we demonstrated that NO production in hemolymph and extrapallial fluid of clams is dose dependent and increases with incubation time with *V. tapetis*. Moreover, the augmentation of NO production seems to be directly correlated to cell rounding and to the loss of pseudopods-forming capacity of hemocytes during the infection process.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Hemocytes in extrapallial fluids and hemolymph have a major influence on immune defense in bivalves synthesizing most of the defense molecules after pathogen attack. Molluscan hemocytes respond to pathogens with a wide variety of humoral factors, such as agglutinins, cytokines-like, lectins, and peptides that provoke changes in cell shape, cell migration, synthesis of reactive oxygen species, phagocytosis and reactive nitrogen intermediates [1–3].

Nitric oxide (NO) synthesis is known to influence innate immunity processes. The radical nitric oxide NO is produced by invertebrate macrophages from the substrate L-arginine through action of nitric oxide synthases (NOS). Three Nitric oxide synthase isoforms produce NO [4]. NOS1 also called nNOS was first seen in neuronal tissues in vertebrates [5]. NOS2 (iNOS) is the inducible form and is Ca<sup>2+</sup> independent. Its importance in immune defense in vertebrates is widely accepted [6–8]. Finally, NOS3 or endothelial NOS exists principally in vertebrates. In invertebrates only the NOS2 isoform is found [9] and is implicated in immune responses [10]. The iNOS synthesizes NO when defense cells are stimulated by foreign epitopes. The lipopolysaccharides (LPS) from *Escherichia coli* were shown to induce NO production in mammalian macrophages. It has been demonstrated that LPS also has an effect on hemocytes

of the European carpet shell clam, *Ruditapes decussatus*, but not on mussels *Mytilus galloprovincialis* [11]. On the other hand, phorbol myristate acetate (PMA), laminarin and Interleukin-2 (IL-2) induce NO in the mussel [11–13]. More recently, pathogenic organisms including parasites and bacteria have been shown to provoke NO production in mollusks [14,15]. Moreover, NO production is induced by the presence of a bacterium *Vibrio* species in mussels and the European carpet shell clams [16,17].

*Vibrio tapetis* is responsible for Brown Ring Disease (BRD) of the clams *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* but induces less disease in *R. decussatus* [18]. Infection with the bacterium leads to a brown deposit of conchiolin in the extrapallial compartment between the mantle and inner shell. Clams can die at advanced stages of the disease, although some clams cover the brown deposit with new inner shell layers in the nacrezation process [19]. Several studies on *R. philippinarum* have described *in vivo* changes in hemocyte concentration and phagocytic activity, hemocyte migration toward the damaged area and transport of calcium carbonate toward the mineralization site after *V. tapetis* infection [20–25]. Moreover, *R. philippinarum* hemocytes lose adherence capability *in vitro* when in contact with *V. tapetis* but not with *Vibrio splendidus* a bacterium that is not pathogenic to the clams [26]. No data have been reported on the production of NO by *R. philippinarum* cells in contact with *V. tapetis*.

The objective of this study was to begin to evaluate a potential link between the production of NO by hemocytes and the

\* Corresponding author.

E-mail address: [Christine.Paillard@univ-brest.fr](mailto:Christine.Paillard@univ-brest.fr) (C. Paillard).

infection process in *R. philippinarum* after *V. tapetis* and *V. splendidus* contact. Especially, we investigated the relationship between NO production and adherence capacity of cells from the hemolymph of *R. philippinarum* *in vitro* challenged with *V. tapetis*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental animals

Clams ( $36 \pm 1$  mm) were provided from SATMAR a bivalve seed production company located in Ile Tudy or collected from wild populations in the Bay of Brest during 2008 (BRD prevalence 1%–5%). All clams used for experiments were asymptomatic and thus considered to be BRD free. Before each experiment, clams were acclimated one week in tanks receiving external seawater at 16 °C. One ml of hemolymph was collected by inserting a sterile syringe and a needle (25G 0.5 × 16 mm) through the hinge and into the posterior adductor muscle sinus of each clam. After hemolymph collection the extrapallial fluid was collected by opening the valves and inserting a second needle (21G 0.8 × 25 mm) between the mantle and shell in the sinusal, central and peripheral compartments. Immediately after the sample collection, both fluids were filtered through an 80 µm screen and maintained in a 1.5 ml microtube on ice to inhibit aggregation of cells. Experiments were conducted at three different months (July, August and September). Pools of 3–6 individuals were made depending on the assay and analyzed in replicates.

### 2.2. Bacteria

The pathogen implicated in the Brown Ring Disease in *R. philippinarum* is *V. tapetis*, one reference strain of *V. tapetis* (CIP 104856 or CECT 4600 isolated during mortalities in 1988) was used for all assays and a non-pathogenic control specie *V. splendidus* (ATCC 25914) [26] was used in the time course of NO production. Those bacteria species were grown in Zobell's medium overnight at 18 °C. The bacterial solution was rinsed with filtered sterile seawater (FSSW) and the concentration determined by flow cytometry or by spectrophotometry at 490 nm absorbance ( $[C] = O.D. \times 1.3 \times 10^9 - 3.6 \times 10^7$ ).

### 2.3. Hemocyte counting by cytometry

The hemocytes concentration of each sample was measured using a flow cytometer (Guava Technology). In brief, 50 µl of collected fluid was distributed in 96-well microplates in triplicate. Cells were stained with 150 µl per well of ViaCount (Guava Viacount reagent 4000-0040), which can discriminate live cells from dead cells and debris and give the final concentration of viable cells expressed in cells ml<sup>-1</sup>.

### 2.4. Experimental *in vitro* challenge

The incubation experiment consisted of the following: 100 µl of hemolymph or extrapallial fluid from each individual was placed in triplicates wells of a 24-well plate to which 200 µl of FSSW were added. According the experiment, 100 µl of bacterial solution or 100 µl of FSSW was then introduced. The time of incubation was 4 h for the first assays (dose effect of bacterial solution and effect of L-NAME (N nitro L-Arginine MethylEster)). For the dose-effect test, hemocytes were incubated for 4 h in three bacteria:hemocytes proportions: 2; 20 and 200 during 4 h incubation.

After the dose-effect experiment, a bacterial concentration of 10<sup>7</sup> ml<sup>-1</sup>, corresponding approximately to hemocyte/bacteria proportion 20, was selected for subsequent tests. L-NAME, a specific

inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, was used at 10 µM to observe the inhibition of NO production during *V. tapetis* contact. To assay NO production coupled with the adhesion capacity, we chose to stop the incubation after 3 h to use the same conditions than in Choquet et al. (2003) [26]. After *in vitro* incubation, the supernatant was sampled and used for NO determination and adhesion capacity of cells as described below.

### 2.5. NO determination

The Griess reagent method was used to determine NO levels by measuring the breakdown products nitrate and nitrite. Briefly, triplicate 50 µl sample supernatants were incubated with 50 µl of 1% sulfanilamide added followed by an additional 10 min of 50 µl of NED (0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride). Absorbance at 540 nm was determined using a UV spectrophotometer (Multiskan). A standard curve was obtained with sodium nitrite (1–100 µM). Experimental NO values were expressed in nitrite concentration (µM) and standardized for  $1 \times 10^6$  hemocytes ml<sup>-1</sup>.

### 2.6. Hemocytes adhesion capacity

Cells remaining in the culture wells were fixed with 6% formalin. From each sample, 150 µl of supernatant, containing the non-adherent cells, was incubated for 30 min with 2 µl SybrGreen (10<sup>-2</sup> of the 10,000× commercial concentration (Invitrogen)), Samples were read in triplicate for 1 min using the Guava cytometer (GuavaEasyPlus). As is described in [26], the number of non-adherent cells contained in the supernatant was compared to the number cells in the initial 100 µl samples. Those results are expressed as a percentage of total cells that are non-adherent.

### 2.7. Statistical analysis

The data were compared using the Student *t*-test. The effect of *V. tapetis* incubation and the time dependence NO production were assessed by using the one-way ANOVA. Results are expressed as the mean ± standard deviation and differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Hemocytes counting

Hemocytes concentrations were  $8 \times 10^5$  hemocytes ml<sup>-1</sup> ( $\pm 0.2 \times 10^5$ ) (data not shown).

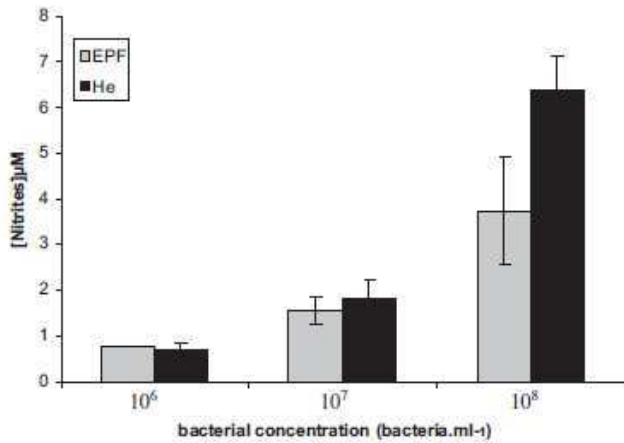
### 3.2. Dose effect of *V. tapetis* on nitrite production in hemolymph and extrapallial fluid

At all concentrations, cells in both hemolymph and extrapallial fluid produced NO when in contact with *V. tapetis*. For both fluids, NO production in the culture medium increased with increasing *V. tapetis* concentration (Fig. 1).

No difference in production of NO was observed between hemolymph and extrapallial fluid for *V. tapetis* concentrations of 10<sup>6</sup> and 10<sup>7</sup> bacteria ml<sup>-1</sup>. A higher production of NO in the hemolymph compared to extrapallial in the fluids was noted at 10<sup>8</sup> bacteria ml<sup>-1</sup> ( $p < 0.0005$ ).

### 3.3. Time course of nitrite production elicited by *V. tapetis* and *V. splendidus*

The NO production in hemolymph was followed during three incubation times (1 h, 4 h, 24 h) and on pools of three individuals



**Fig. 1.** NO production expressed in the concentration of nitrites ( $\mu\text{M}$ ) in extrapallial fluid (EPF) (in gray) and in hemolymph (He) (in black) after 4 h incubation with three *V. tapetis* concentration solutions (6 individuals per histogram analyzed in duplicate).  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$  correspond approximately to a bacteria/hemocyte of 2, 20 and 200 respectively. Hemolymph and extrapallial fluid samples were collected from the same individuals. Values are standardized for an initial hemocytes concentration at  $1 \times 10^6$  hemocytes  $\text{ml}^{-1}$  and standardized by subtracting values obtained in sterile seawater hemocytes as control. Month of experiment: August.

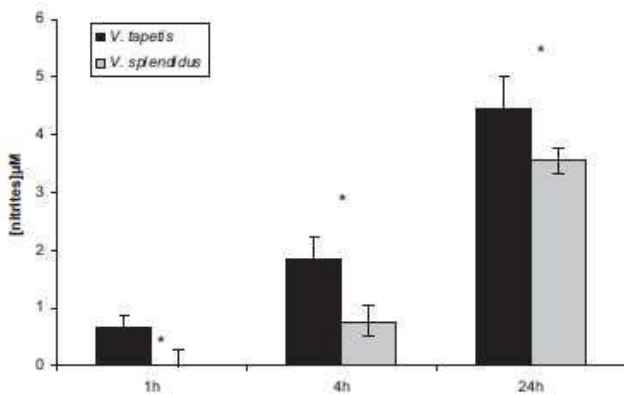
(Fig. 2). NO production rose during *in vitro* incubation with both *V. tapetis* and *V. splendidus*. Moreover, at each time the NO production was higher when cells were exposed to *V. tapetis* than *V. splendidus* ( $p < 0.00001$ ). Hemolymph produced twice as much NO after *V. tapetis* than after *V. splendidus* contact.

**3.4. Effect of L-NAME on NO production with *V. tapetis***

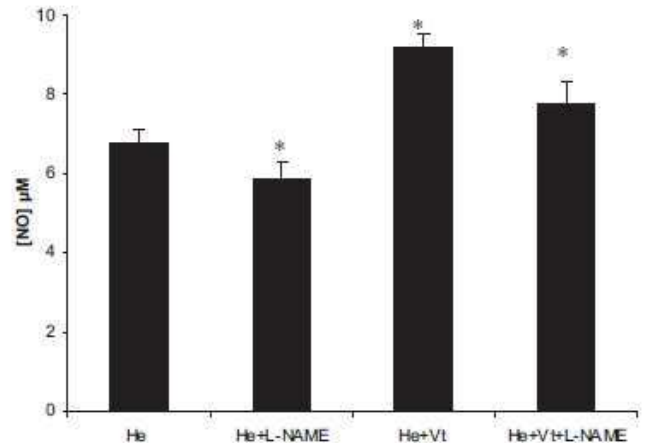
The presence of *V. tapetis* has increased NO production ( $p = 0.0000$ ). L-NAME has an inhibitor effect on NO production when added only with hemocytes ( $p = 0.05$ ). Moreover, when L-NAME was added to the incubation medium along with *V. tapetis*, NO production decreased significantly ( $p = 0.0006$ ) (Fig. 3).

**3.5. Effect of L-NAME on adhesion capacity with *V. tapetis***

L-NAME has no effect on the percentage of non-adherent cells in hemolymph only ( $p = 0.21$ ) (Fig. 4). In presence with *V. tapetis*, the



**Fig. 2.** NO production expressed in the concentration of nitrites ( $\mu\text{M}$ ) at 1 h, 4 h and 24 h incubation with *V. tapetis* and *V. splendidus* solution (3 pools of three individuals analyzed in triplicate). Values are standardized for an initial hemocytes concentration at  $1 \times 10^6$  hemocytes  $\text{ml}^{-1}$  and standardized by subtracting values obtained in sterile seawater hemocytes as control. Asterisks mean significant differences on data values between times incubation and *Vibrio* species. Month of experiment: July.

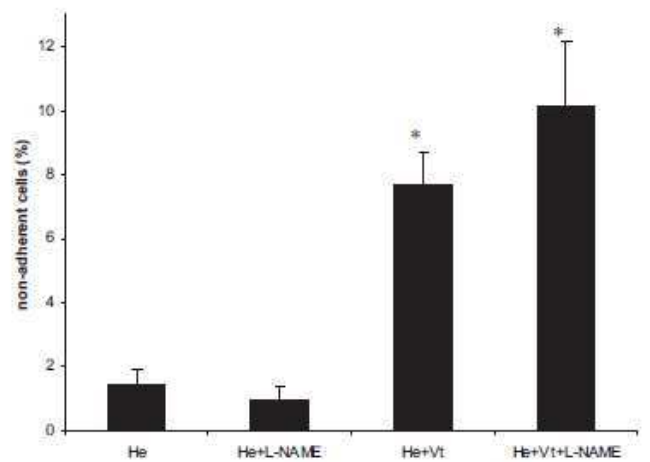


**Fig. 3.** NO production expressed in the concentration of nitrites ( $\mu\text{M}$ ) after 3 h incubation with *V. tapetis* (Vt) solution at  $10^7$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$  or *V. tapetis* solution at  $10^7$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$  with or without L-NAME (10  $\mu\text{M}$  final) ( $n = 3$  pools of three individuals in quadruplicates per histogram). Asterisks mean significant difference with the hemolymph (He) control.  $10^7$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$  means a *V. tapetis*/hemocytes ratio 20. Month of experiment: September.

percentage of non-adherent cells increases ( $p = 0.0000$ ). Moreover, the percentage of non-adherent cells is higher than the percentage with *V. tapetis* when L-NAME is added ( $p = 0.05$ ).

**4. Discussion**

We have demonstrated in this study that *R. philippinarum* hemocytes produced nitric oxide (NO) when in contact with the pathogen *V. tapetis* and that this production is dose dependent. Indeed, a *V. tapetis*/hemocyte ratio 20 increases 10 folds the NO production. The levels of NO produced are similar to those found in *M. galloprovincialis* and in the European carpet shell *R. decussatus*. Costa et al. (2009) [17] showed variation around 1  $\mu\text{M}$  of NO in the mussels after incubation with *Vibrio anguillarum* and Tafalla et al. (2003) [16] reported the NO production between 1 and 3  $\mu\text{M}$  when *R. decussatus* hemocytes were incubated with *V. tapetis*. Our results



**Fig. 4.** NO production expressed in the concentration of nitrites ( $\mu\text{M}$ ) present in the hemolymph supernatant after 3 h incubation without or with *V. tapetis* (Vt) ( $10^7$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$ ) and with *V. tapetis* ( $10^7$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$ ) plus L-NAME (10  $\mu\text{M}$  final) ( $n = 3$  pools of three individuals in quadruplicates per histogram). Values are standardized for an initial hemocyte concentration at  $10^6$  hemocytes  $\text{ml}^{-1}$ . Asterisks mean significant differences with hemolymph (He) control.  $10^7$  bacteria  $\text{ml}^{-1}$  means a *V. tapetis*/hemocytes ratio 20. Month of the experiment: September.

are between 2 and 8  $\mu\text{M}$  of NO production by *R. philippinarum* hemocytes after *V. tapetis* contact.

The majority of assays were performed on hemolymph samples rather than on the extrapallial fluid since the concentration of NO produced after contact of *V. tapetis*/hemocyte ratio 200 was significantly higher in the hemolymph than in the extrapallial fluid (Fig. 1). Moreover, hemolymph can be collected nondestructively, whereas collection of extrapallial fluid typically requires the opening of valves either by killing or after anesthesia [23]. We expected to observe more NO production in extrapallial fluid than in hemolymph. Indeed, Allam et al. (2002) [27] reported greater phagocytic activity in extrapallial fluid compared to hemolymph (60%–20% respectively). Moreover, the proportion of granulocytes is higher in extrapallial fluids than in hemolymph [22]. Donaghy et al. (2009) [28] shown that the granulocytes are the major ROS producers in hemolymph cells in the oysters *Crassostrea ariakensis*. Thus, if there is more phagocytic activity, we might expect to find more adherent cells or cells with pseudopods that could be the major NO producers as granulocytes. In the tests of this study, we haven't discriminated the different hemocyte populations but we know there were no differences in the total hemocytes concentrations between the summer samplings. The assays gave similar NO values between both origins site of clams (SATMAR Aquaculture Company) and Bay of Brest. NO production by mussels *M. galloprovincialis* hemocytes incubated with IL-2 [29] showed higher levels in winter than in summer. The basal NO production by hemocytes of *M. galloprovincialis* is suggested to be maximal in summer coinciding to highest plankton production [29]. Moreover, we noted in Soudant et al. (2004) [30] that the concentration of *R. philippinarum* circulating hemocytes increases in spring and summer.

Our results also indicate that NO production was higher after contact with *V. tapetis* than after *V. splendidus* contact (Fig. 2). When *R. philippinarum* hemocytes are incubated *in vitro* with *V. tapetis*, they become rounded and lose their ability to adhere to the surface of tests wells. *V. tapetis* reduces by 4–6 fold the adhesion capacity of *R. philippinarum* compare to controls, while *V. splendidus* seemed not to have an effect on adhesion capacity [26]. Moreover, phagocytosis is diminished by the *V. tapetis* extracellular products (ECP) while *V. splendidus* ECP involve more phagocytosis [31]. The higher

NO production could balance the diminution of phagocytosis process by *V. tapetis* and could follow from the difference intensity of *Vibrio* species virulence. *R. philippinarum* hemocytes react specifically to *V. tapetis*.

We suggest the existence of a link between NO production and the diminution of hemocyte adhesion capacity (Fig. 5). Indeed, in our study, we have also confirmed previous findings [26] that the percentage of non-adherent cells increased in the presence of *V. tapetis*. In the same time, the production of NO increased as it is usually seen in host–pathogen interactions. Moreover, when the Nitric Oxide Synthase inhibitor L-NAME was added to the *V. tapetis*-hemocyte mixture, the NO production declined and the percentage of non-adherent hemocytes in the supernatant rose (Figs. 3–5). Those results insinuate that the inhibition of the enzyme Nitric Oxide Synthase by the L-NAME had an effect on the hemocytes in contact with *V. tapetis*. Indeed, the L-NAME addition resulted in a decline of the NO production and confirmed the diminution of the NOS activity. The reduction of NO production and the increase in cell rounding suggest that the clam's hemocytes lose some immune capacities because rounding implies a loss of the ability to form pseudopods, which are essential to phagocytosis and encapsulation of pathogens. We hypothesize that the hemocytes that do not lose their capacity to form pseudopods and are attached in the *in vitro* assay are the cells that synthesize NO. This would explain the diminution of NO and the increase of non-adherent cells when the NOS is inhibited. Thus, the NO inhibition could suggest an ineffectual capacity at killing *V. tapetis* and the NO production as an alternative to phagocytosis process as suggested Taffala et al. (2003) [16,32]. NO synthesized in Manila clam hemocytes infected by *V. tapetis* seems to be an alternative anti-bacterial response to thwart the rounding cells and the low level of phagocytosis process.

In spite of the large number of studies concerning NO production, the NOS gene has been identified in only a few species of invertebrates including insects, two shrimp species [33,34], one snail [35], and one mollusk [36]. A NOS-like gene in the oyster *Crassostrea virginica* has been isolated [37] but the gene in *R. philippinarum* has not yet been identified. It would be interesting to follow the expression of the *R. philippinarum* NOS gene at different times during incubation with *V. tapetis* to correlate the NO production with the NOS activity or NOS gene expression. As a first

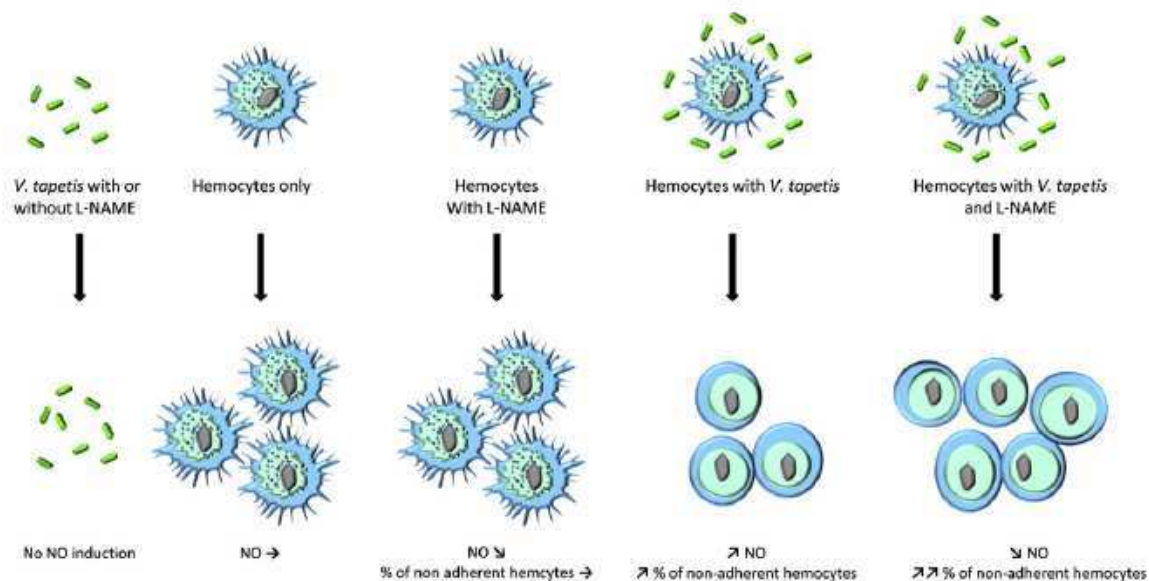


Fig. 5. Schematic representation of NO production and cell rounding after *V. tapetis* contact and L-NAME addition on *R. philippinarum* hemocytes. → means a basal level; ↗ means an increase and ↘ means a decrease. The *V. tapetis* phagocytosis process is not represented in this figure.



step in this work, we are in process to isolate the *R. philippinarum* NOS gene. Isolation of the NOS gene could allow us to differentiate NOS activity in adherent and non-adherent hemocytes to better understand the *V. tapetis* infection process.

Moreover, a Suppression Subtractive Hybridization (SSH assay) is being conducted in our lab to identify genes involved in the biological processes that occur after *V. tapetis* contact with hemolymph.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the SATMAR company for providing clams. The study was supported by the Région Bretagne and the ANRT. Special thank goes to S.E. Ford for English corrections.

## References

- Ottaviani E, Franchini A, Cassanelli S, Genedani S. Cytokines and invertebrate immune responses. *Biol Cell* 1995;85:87–91.
- Donaghy L, Lambert C, Choi K-S, Soudant P. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects. *Aquaculture* 2009;297:10–24.
- Labreuche Y, Lambert C, Soudant P, Boulo V, Huvet A, Nicolas J-L. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarius* strain 01/32. *Microbes Infect* 2006;8:2715–24.
- Forstermann U, Boissel J-P. Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase. *FASEB J* 1998;12:773–90.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 1991;7:615–24.
- Lyu SY, P Wb. production of cytokine and NO by RAW 264.7 macrophages and PBMC in vitro incubation with flavonoids. *Arch Pharm Res* 2005;28:573–81.
- Lejeune P, Lagadec P, Onier N, Pinard D, Ohshima H, Jf J. Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression. *J Immunol* 1994;152:5077–83.
- Sessa WC. The nitric oxide synthase family proteins. *J Vasc Res* 1994;31:131–41.
- Imamura M, Yang J, Yamakawa M. cDNA cloning, characterization and gene expression of nitric oxide synthase from the silkworm, *Bombyx mori*. Blackwell Science Ltd; 2002. pp. 257–65.
- Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 2000;4:423–30.
- Novas A, Cao A, Barcia R, Ramos-Martinez JL. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:390–4.
- Gourdon I, Guérin MC, Torreilles J, Roch P. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide* 2001;5:1–6.
- Arumugam M, Romestand B, Torreilles J, Roch P. In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur J Cell Biol* 2000;79:513–9.
- Villamil L, Gómez-León J, Gómez-Chiarri M. Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev Comp Immunol* 2007;31:968–77.
- Mar Costa M, Novoa B, Figueras A. Influence of [beta]-glucans on the immune responses of carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Fish Shellfish Immunol* 2008;24:498–505.
- Tafalla C, Gómez-León J, Novoa B, Figueras A. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Dev Comp Immunol* 2003;27:197–205.
- Costa MM, Prado-Alvarez M, Gestal C, Li H, Roch P, Novoa B, et al. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish Shellfish Immunol* 2009;26:515–23.
- Paillard C, Maes P. Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d'un *Vibrio* sp. *CR Acad Sci Paris* 1990;310:15–20.
- Trinkler N, Sinquin G, Querne J, Paillard C. Resistance to brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: a study of selected stocks showing a recovery process by shell repair. *J Invertebr Pathol* 2010;104:8–16.
- Oubella R, Maes P, Paillard C, Auffret M. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis Aquat Org* 1993;15:193–7.
- Allam B, Paillard C. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis Aquat Org* 1998;33:123–8.
- Allam B, Ashton-Alcox KA, Ford SE. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Dev Comp Immunol* 2001;25:365–75.
- Ford SE, Paillard C. Repeated sampling of individual bivalve mollusks I: intraindividual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Fish Shellfish Immunol* 2007;23:280–91.
- Flye-Sainte-Marie J, Soudant P, Lambert C, Le Goïc N, Goncalvez M, Travers M-A, et al. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle. *J Exp Mar Biol Ecol* 2009;377:1–11.
- Trinkler N, Bardeau J-F, Marin F, Labonne M, Jolivet A, Crassous P, et al. Mineral phase in shell repair of Manila clam *Ruditapes philippinarum* affected by brown ring disease. *Dis Aquat Org* 2011;93:149–62.
- Choquet G, Soudant P, Lambert C, Nicolas J-L, Paillard C. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Org* 2003;57:109–16.
- Allam B, Paillard C, Ford SE. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis Aquat Org* 2002;48:221–31.
- Donaghy L, Kim B-K, Hong H-K, Park H-S, Choi K-S. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. *Fish Shellfish Immunol* 2009;27:296–301.
- Novas A, Barcia R, Ramos-Martinez JL. Nitric oxide production by haemocytes from *Mytilus galloprovincialis* shows seasonal variations. *Fish Shellfish Immunol* 2007;23:886–91.
- Soudant P, Paillard C, Choquet G, Lambert C, Reid HI, Marhic A, et al. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (= *Tapes*, = *Ruditapes*) *philippinarum*. *Aquaculture* 2004;229:401–18.
- Allam B, Ford SE. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following in vitro challenge. *Fish Shellfish Immunol* 2006;20:374–83.
- Tafalla C, Novoa B, Figueras A. Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2002;132:423–31.
- Yao C-L, Ji P-F, Wang Z-Y, Li F-H, Xiang J-H. Molecular cloning and expression of NOS in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 2010;28:453–60.
- Inada M, Mekata T, Sudhakaran R, Okugawa S, Kono T, El Asely AM, et al. Molecular cloning and characterization of the nitric oxide synthase gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 2010;28:701–11.
- Labbé P, McTaggart SJ, Little TJ. An ancient immunity gene duplication in *Daphnia magna*: RNA expression and sequence analysis of two nitric oxide synthase genes. *Dev Comp Immunol* 2009;33:1000–10.
- Scheinker V, Fiore G, Di Cristo C, Di Cosmo A, d'Ischia M, Enkolopov G, et al. Nitric oxide synthase in the nervous system and ink gland of the cuttlefish *Sepia officinalis*: molecular cloning and expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:1204–15.
- Ivanina AV, Eilers S, Kurochkin IO, Chung JS, Techa S, Piontkivska H, et al. Effects of cadmium exposure and intermittent anoxia on nitric oxide metabolism in eastern oysters, *Crassostrea virginica*. *J Exp Biol* 2010;213:433–44.

## **Chapitre 4: Sélection des géniteurs**



## Introduction

Afin de caractériser des familles à sensibilité différentielle face à la maladie de l'anneau brun, la première étape est de sélectionner des géniteurs identifiés selon leur capacité de résistance face à la vibriose.

Ce genre d'études a déjà été entrepris sur des populations d'huîtres atteintes par des agents pathogènes induisant une forte mortalité : *C. virginica*, *O. edulis*, *S. glomerata* et *C. gigas* (Davis et Barber, 1999, Culloty *et al.*, 2001, Nell et Hand, 2003, Dégremont *et al.*, 2010). La sélection a été réalisée par le taux de survie différentiel entre populations.

L'avantage de la MAB est de ne pas induire systématiquement la mort de l'hôte. Le symptôme principal facilement identifiable est celui du développement du dépôt de conchyoline observée sur la coquille interne des valves. En effet, cette vibriose se développe de façon graduelle et la palourde peut soit guérir en réparant la coquille soit ne pas montrer de symptômes macroscopiques. Seuls les stades très avancés, associés à un coût énergétique élevé mèneront à la mort du bivalve (Flye-Sainte-Marie *et al.*, 2009b). Un des critères de sélection des géniteurs est donc basé sur le développement de la maladie, c'est-à-dire la quantité et la dispersion du dépôt brun. Ce diagnostic réalisé sous anesthésie permet de conserver les animaux vivants (Ford et Paillard, 2007). D'autres caractères de sensibilité à la MAB peuvent être des caractères physiologiques et biochimiques au niveau de l'hémolymphe. Le fluide hémolympatique joue un rôle de défense considérable face aux attaques d'agents pathogènes (pour Revue Donaghy *et al.*, 2009). Ainsi, des palourdes peuvent être caractérisées selon leur potentiel d'efficacité immunitaire face à la MAB.

De plus, le modèle expérimental MAB est standardisé et nous permet donc des mesures fiables des réponses immunitaires couplées au dépôt de conchyoline et à la réparation coquillière (Allam *et al.*, 2006b, Choquet, *et al.*, 2003, Trinkler *et al.*, 2010).

Les animaux ne présentant pas de dépôt de conchyoline sont donc considérés comme des individus à capacité supérieure de lutte contre la maladie par rapport à ceux qui le développent. De plus, les animaux recouvrant le dépôt de conchyoline par une nouvelle couche calcifiée sont

également des individus ayant une meilleure capacité de défense contre la maladie. Les géniteurs sont alors triés en catégories selon leur capacité de réparation coquillière ou de faible développement de la maladie. Les familles sont produites suivant des croisements contrôlés entre géniteurs pour avoir un panel de sensibilité différentielle et dans le meilleur des cas sur plusieurs générations tenter d'observer des caractères héréditaires de résistance à la MAB.

Dans ce chapitre, une série de sélections de géniteurs sur deux années successives est entreprise sur des palourdes provenant de deux lots déjà reconnus pour leurs différentes sensibilités face à la MAB (Trinkler *et al.*, 2010). Des données sur les paramètres hématocytaires au niveau individuel sont obtenues sur les différents lots de géniteurs.

## 1- Sélection des géniteurs de Landéda suite à une incubation bactérienne

1-1 Incubation après inoculation par *Vibrio tapetis* et Diagnostic de la MAB.

Le modèle de sélection initial était de choisir des individus selon leur niveau de développement et de guérison du symptôme de MAB afin d'effectuer des croisements. Les animaux de Landéda récoltés en décembre 2007 proviennent de deux lots : 1) lot R (PJ-06-10) dit moins susceptible (ou « résistant ») à la MAB et 2) lot S (PJ-06-07) standard dit à sensibilité plus élevée (Fig. 17). Ces animaux avaient été produits par la SATMAR en mai 2006 et semés à Landéda en automne 2006.

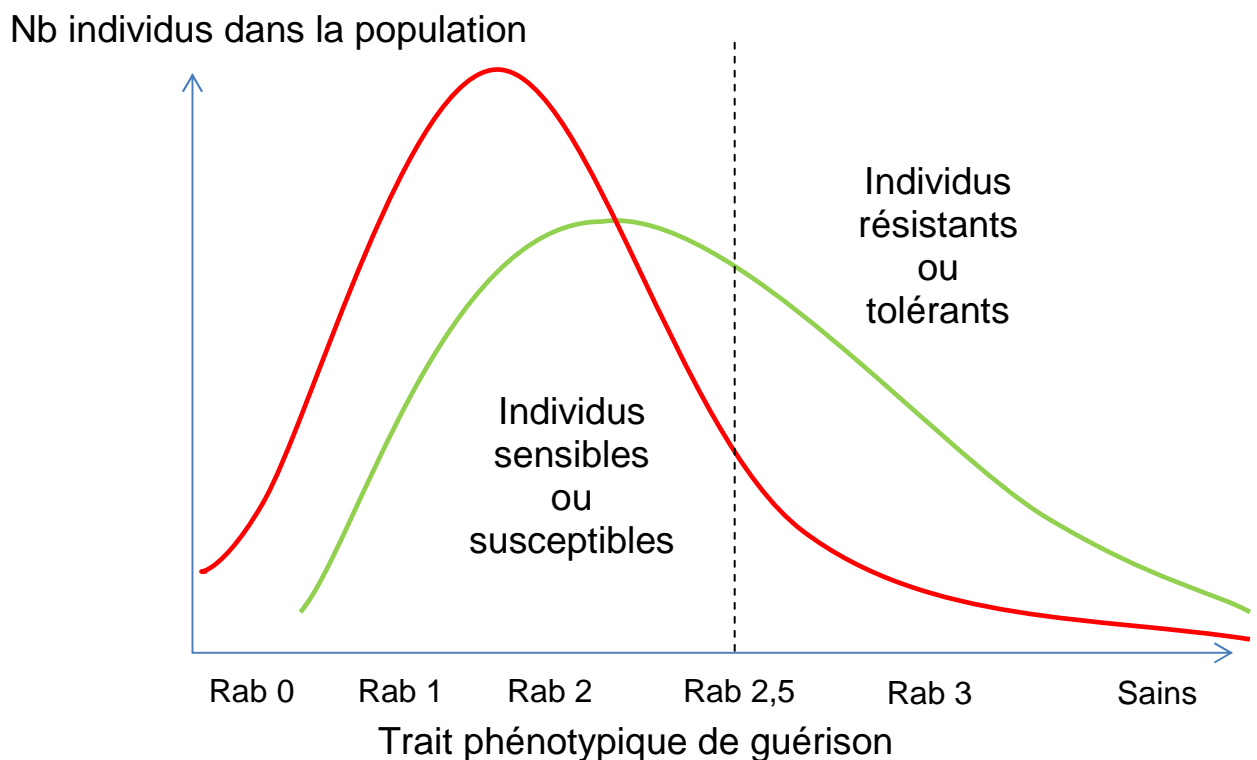


Fig. 17: Schéma de la distribution des individus selon leur caractère résistant/tolérant ou sensible/susceptible à la maladie de l'anneau par leur niveau de réparation coquillière (guérison). La cloche rouge correspond au lot Standard S PJ-06-07 et la cloche verte au lot dit Résistant R PJ-06-10.

Au total, sur les 350 palourdes récoltées de chaque lot, 333 R et 327 S ont été inoculés par *V. tapetis*. Après 1 mois d'incubation, 328 R et 321 S ont été

anesthésiées. La mortalité observée pour les deux lots R et S au cours de l'incubation est très faible (1.2% et 1.8 % respectivement). Seulement 242 R et 240 S ont pu être diagnostiquées après anesthésie (Tab. 4). Sur la totalité des palourdes récoltées, 68.9% ont été analysées et triées.

Tab. 4. : Nombre de palourdes restantes avant chaque étape de la sélection depuis la récolte sur le terrain jusqu'à la biopsie du manteau.

	Nb récoltées	Nb inoculées	Nb anesthésiées	Nb diagnostiquées	Nb sélectionnées et biopsées
R	350	333	328	242	100
S (Sr et Ss)	350	327	321	240	98

Globalement, le lot R présentait d'avantage de palourdes en stades avancés de réparation (60%) comparé au lot S (23%) et très peu de palourdes en stade 1 (Fig. 18). Les résultats sont en accords avec ceux précédemment obtenus par Trinkler *et al.*, 2010 sur ces deux mêmes lots.

Cependant, tous les individus du lot R diagnostiqués en stade 2.5 de réparation n'ont pas été gardés pour les pontes afin de limiter au nombre de 100 les géniteurs de ce lot. L'anesthésie a également permis de prélevé un petit morceau manteau pour en extraire de l'ADN afin de déterminer le génotype sur plusieurs microsatellites. Seuls les individus sélectionnés ont subi une biopsie (Tab. 4).

Tous les individus asymptomatiques considérés comme sains du lot R et du lot S ont été gardés. Des palourdes montrant une faible étendue de la MAB avec une bonne réparation 2.5 ou 3 ont été choisies en tant que géniteurs résistants respectivement nommés R et Sr. Les individus du lot S notés Ss, les moins tolérants, étaient des individus aux stades de réparation 1 ou 2.

La taille des palourdes des 2 lots était relativement petite: 27+/-2 et 28+/-2 mm.

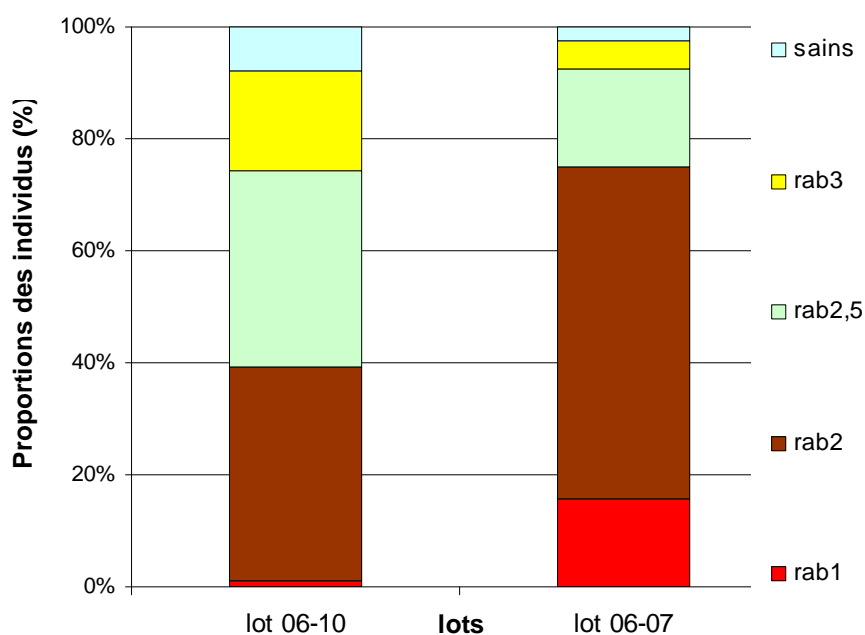


Fig. 18: Proportion d'individus diagnostiqués des deux lots (Standard S PJ-06-07 et Résistant R PJ-06-10) observée par stade de réparation après anesthésie au MgCl<sub>2</sub>. (rab= réparation de l'anneau brun) ;

Le nombre de géniteurs sélectionnés pour les pontes semblait suffisant pour effectuer les croisements voulus (Tab.5). En effet, 100 R, 50 Sr et 48 Ss permettaient d'obtenir une quantité de familles assez importante. De plus, la diversité génétique des géniteurs (cf chapitre 5) au sein des deux lots permettait d'obtenir des familles identifiables par la suite.

Tab. 5 : Nombre des palourdes sélectionnées pour la reproduction et croisements de géniteurs envisagés. Trois catégories de sensibilités face à la MAB (R et Sr = individus à tolérance élevée, Ss= individus à tolérance faible):

Nb palourdes sélectionnées pour la reproduction	Croisements entre géniteurs
100 R	R x R
50 Sr	R x Sr
48 Ss	R x Ss
	Ss x Ss

Chaque palourde sélectionnée a été numérotée au marqueur noir indélébile et remis en eau à 12°C jusqu'à leur envoi à Marennes pour initier le processus de maturation en vue de prochaines pontes.



## 1-2 Survie des géniteurs sélectionnés

Les individus testés, remis en eau en attendant l'expédition sur le site de la SATMAR de Marennes, ont connu une mortalité importante qui a atteint tous les individus sélectionnés Ss, beaucoup de Sr et quelques R. Le nombre restant se limitait à 85 R et 15 Sr (Tab. 6).

Le site de Marennes est riche en phytoplancton et les bassins sont bien contrôlés. En outre, la température est plus propice à la maturation. De plus, le site de Marennes est en-dessous de la zone où la maladie est recensée.

Au cours du grossissement et de la maturation un autre évènement de mortalité a touché les géniteurs sélectionnés. Par contre, d'autres palourdes témoins, c'est-à-dire n'ayant pas subi de biopsie et d'anesthésie, ont accru la taille de leur coquille. Quelques-unes ont mûri.

De plus, âgées seulement de 1 année et quelques mois au moment de l'expérimentation, les palourdes n'ont pas mûri comme nous l'aurions espéré. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'elles étaient trop jeunes et trop petites pour la maturation. Seuls quelques individus ont développé des gonades. En effet, la quantité de gamètes est positivement corrélée à la taille et à l'âge de l'individu (Calvez *et al.*, 2003).

En conséquence de tous ces évènements de mortalité, peu d'animaux étaient disponibles pour les pontes. **La quasi-totalité des palourdes sélectionnées du lot S sont mortes à Marennes laissant 3 Sr survivantes et seulement 22 R (Tab. 6).** Néanmoins, les individus restants ont été emmenés à la station SATMAR de Leucate pour des pontes futures.

La biopsie du manteau est supposée être en cause dans les mortalités observées. Elle s'avère être néfaste à la croissance et provoquerait un affaiblissement de l'animal. Le manteau est l'organe principal de la formation coquillière. L'animal a probablement investi beaucoup d'énergie pour réparer son manteau au niveau de la biopsie au détriment du développement gonadique.

Tab. 6: Nombre restant et pourcentage de mortalité des palourdes testées avant leur envoi à Marennes et avant leur envoi à Leucate.

	Avant envoi sur Marennes		Avant envoi sur Leucate	
	<i>Nombre de palourdes restantes</i>	<i>% de palourdes mortes</i>	<i>Nombre de palourdes restantes</i>	<i>% de palourdes mortes</i>
R	85	15	22	74
Sr	15	70	3	94
Ss	0	100	0	/

## 2- Sélection des géniteurs de Chausey

Le faible succès de reproduction obtenu par les géniteurs de Landéda nous a menés à une nouvelle sélection de géniteurs. Celle-ci a été effectuée sur des individus ayant connu une meilleure croissance. En effet, les animaux avaient un âge un peu plus avancé que précédemment et leur site de culture privilégié est plus propice à leur croissance. Les géniteurs provenaient des Iles Chausey, un des rares sites de production de la partie Nord de la France, où la MAB n'a pas été recensée au cours des dernières années.

L'état physiologique pour une meilleure défense face à l'attaque de *V. tapetis* est un critère pour la sélection des géniteurs. Ainsi, plusieurs paramètres hémolymphatiques ont été analysés afin d'en isoler un ou plusieurs pour permettre de discriminer les palourdes suivant leur état hémocytaires et de faire des corrélations entre ces paramètres. Cependant, le nombre final de tests biologiques sur les géniteurs devait être limité pour ne pas influencer sur leur maturation et leur survie.

Les tests ont été effectués sur des individus du même lot R que celui de Landéda et d'un autre lot standard S. Les paramètres analysés concernent la concentration et la viabilité des cellules de l'hémolymphe, l'activité phagocytaire, la production de ROS et l'adhérence.

La limite d'hémolymphe prélevée était de 1000 $\mu$ l pour faire un maximum de tests.

Cependant, la quantité d'hémolymphe n'a pas été suffisante pour tous les individus et certains individus ne sont donc pas représentés dans certains tests particulièrement pour la production de ROS.

Les analyses ont été effectuées au mois de juin pendant la période de maturation des palourdes. Le sexe ratio a donc pu être déterminé sur les deux lots. Il est proche de 1. La taille des palourdes est de l'ordre de 33.3 mm (+/- 0.8) pour le lot R et 36.8 mm (+/- 2.2) pour le lot S.

## 2-1 Résultats moyennés des paramètres hématocytaires pour les deux lots R et S (Tab.7).

Tab 7 : Paramètres physiologique de l'hémolymphe des lots R et S. [THC] concentration totale en hémocytes cellules.ml<sup>-1</sup>, viabilité en % de cellules vivantes, Phago= activité phagocytaire en % de cellules phagocytaires, CNA : pourcentage de cellules non adhérentes en EMSF et avec *V. tapetis* (Vt), ratio d'adhérence ; production de ROS entre les deux conditions EMSF et Vt en U. A. ns et s pour différence statistique non significative et significative à p<0.05.

Paramètre hématocytaire	Lot (PJ-06-10)	Lot S (PJ-06-9)	
THC x10 <sup>5</sup>	4,7 (+/- 0,9)	3,8 (+/- 0,7)	ns
Viab	97,0 (+/- 0,7)	96,3 (+/- 0,8)	ns
Phago	24,9 (+/- 5,0)	23,2 (+/- 4,4)	ns
%cell EM	4,3 (+/- 1,9)	6,9 (+/- 1,4)	s
%cell Vt	7,6 (+/- 2,5)	11,8 (+/- 2,3)	s
Ratio	2,7 (+/- 0,8)	1,9 (+/- 0,4)	s
ROS prod	102,6 (+/- 11,2)	111,5 (+/- 14,0)	ns

### Concentration hématocytaire

Aucune différence entre les deux lots n'a été observée avec une moyenne générale de  $4.3 \cdot 10^5$  (+/-  $5.8 \cdot 10^4$ ) hémocytes/ml.

### Viabilité cellulaire

La viabilité est élevée, sa valeur générale est estimée à 96.6 % +/-0.6 de cellules vivantes.

Nous n'obtenons pas de différence significative entre les lots. Cependant, une variabilité plus importante est notée dans le lot standard.

### Activité phagocytaire

Les valeurs moyennes des lots R et de S ne diffèrent pas statistiquement. La moyenne générale donne 24% (+/-3.2) de cellules phagocytaires.

### Production de ROS

Les valeurs moyennes des lots R et de S ne diffèrent pas statistiquement avec une moyenne de 106 U.A (+/- 8.9).

### Adhérence

Le pourcentage moyen de cellules non adhérentes (CNA) en contact avec l'EMSF (état basal) montre une tendance plus faible pour le lot R que pour le lot S (4.3 % +/-1.9 et 6.9% +/-1.4 respectivement). De plus, le pourcentage de CNA augmente avec le contact du *V. tapetis* pour les deux lots R et S (7.6% +/-2.6 et 11.8% +/-2.3 respectivement). La même tendance entre les deux lots

est obtenue pour les deux conditions EMSF et *V. tapetis*. De plus, les erreurs standards sont fortes à cause de la variabilité interindividuelle dans chacune des populations.

La valeur du ratio du lot R est plus forte que celui du lot S (2.7 et 1.9 respectivement).

## 2-2 Corrélations entre paramètres hématocytaires

Les moyennes de chaque paramètres n'étant pas significativement différents entre les deux lots des analyses de corrélations entre paramètres et donc plus au niveau individuel ont permis d'observer des différences entre les deux lots. Les corrélations significatives ( $p < 0.05$ ) obtenues entre les paramètres hématocytaires ne se retrouvent pas d'un lot à l'autre (Tab. 8). En effet, des corrélations entre la THC et le pourcentage de CNA en EMSF et la production de ROS observées dans le lot R n'existent pas dans le lot S. Inversement, le ratio entre cellules non adhérentes et la phagocytose ainsi que les pourcentages de CNA en EMSF et en contact avec *V. tapetis* sont corrélés dans le lot S et non corrélés dans le lot R. Cependant des corrélations persistent au niveau des deux lots : Ratio-THC et Ratio-pourcentage cellules non adhérentes en EMSF.

D'autre part, la tendance observée pour la droite de régression entre la phagocytose et le nombre de cellules non adhérentes en EMSF est inversée entre les deux lots. Elle est positive pour le lot R (0.36) et négative pour le lot S (-0.38). Lorsque le nombre de CNA en EMSF augmente, la phagocytose augmente pour le lot R mais elle diminue pour le lot S.

Tab.8: Coefficients de corrélation entre les paramètres hématocytaires pour les lots R et S. [THC] concentration totale en hématocytes cellules.ml<sup>-1</sup>, viabilité en % de cellules vivantes, Phago= activité phagocytaire en % de cellules phagocytaires, production de ROS entre les deux conditions EMSF et Vt en U. A, CNA : pourcentage de cellules non adhérentes en EMSF et avec *V. tapetis* (Vt), ratio d'adhérence. \* indique une corrélation significative pour P<0.05.

<b>R</b>								
	Viabilité	CNA EMSF	CNA Vt	Ratio	Phago	ROS EMSF	ROS Vt	ROS production
THC x10 <sup>5</sup>	0,38	(-)0,52 *	(-)0,06	0,46 *	(-)0,15	(-)0,75 *	(-)0,40	0,54 *
Viab		(-)0,36	0,2	0,35	0,62*	(-)0,55	(-)0,08	0,63 *
CNA EMSF			0,27	(-)0,63 *	0,36	0,47	0,02	(-)0,43
CNA Vt				0,43 *	0,34	0,32	0,44	(-)0,35
Ratio					0,27	(-)0,27	(-)0,41	(-)0,09
Phago						0,22	0,36	(-)0,06
ROS EMSF							0,86 *	(-)0,68
ROS Vt								(-)0,42
<b>S</b>								
THC	0,29	(-)0,32	0,03	0,43*	0,31	(-)0,75 *	(-)0,67 *	0,5
Viab		(-)0,34	0,1	0,61*	0,26	(-)0,39	(-)0,32	0,18
CNA EMSF			0,71*	(-)0,45*	(-)0,38	0	(-)0,10	(-)0,26
CNA Vt				0,26	0,1	(-)0,22	(-)0,31	(-)0,25
Ratio					0,66*	(-)0,41	(-)0,29	0,17
Phago						(-)0,31	(-)0,33	(-)0,03
ROS EMSF							0,87 *	(-)0,46
ROS Vt								0

## 2-3 Analyses multivariées des paramètres sur les deux lots de Chausey

L'analyse multivariée en composante principale (ACP) a permis de distinguer, pour plus de 59%, les deux lots R et S provenant de Chausey (Fig. 19). La première composante explique 30.5% de la variabilité avec de fort poids des variables : ratio d'adhérence, pourcentage de cellules décollées (CNA) et phagocytose pour les deux lots. La deuxième composante explique 28.7% de la variabilité entre les deux lots. De plus, la variable CNAemsf s'isole pour les deux lots. Une régression multiple permet en plus de sélectionner les animaux selon leur état physiologique expliqué par les paramètres hématocytaires (Fig.20). Ainsi, les individus se distinguent en deux groupes grâce à l'équation de la régression. En effet, lorsque le CNAemsf est faible (<4% de cellules non adhérentes) la valeur de la composante est négative. Les animaux correspondant à ces valeurs sont en état physiologiques de base bénéfique et seront des géniteurs potentiels pour les croisements, à l'inverse de ceux se situant dans le deuxième groupes (CNAemsf >4%).

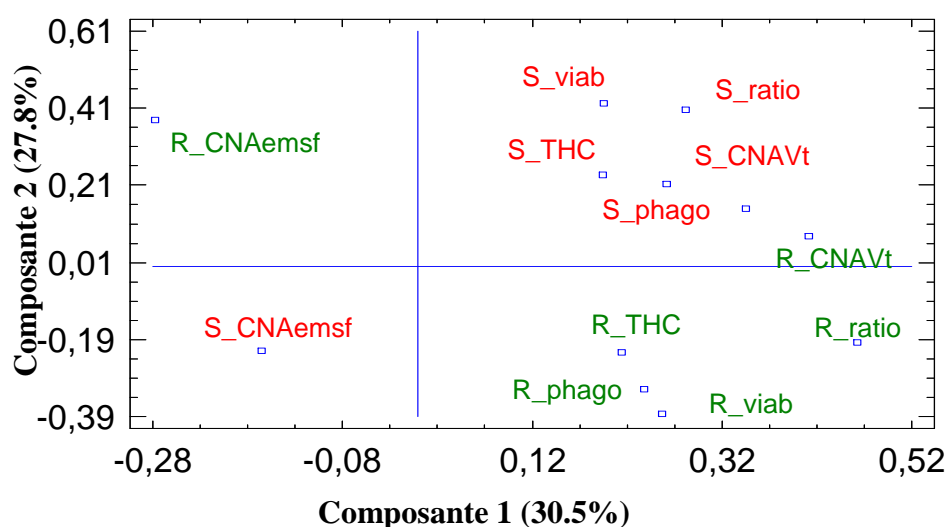


Fig .19 : Analyse en composante principale sur les paramètres hématocytaires des deux lots R (PJ-06-10) et S (PJ-06-9). Viab : viabilité des hématocytes ; THC : concentration totale en hématocytes ; phago : activité de phagocytose ; CNA : pourcentage de cellules non adhérentes et emsf : eau de mer stérile et Vt : en contact à *Vibrio tapetis*.

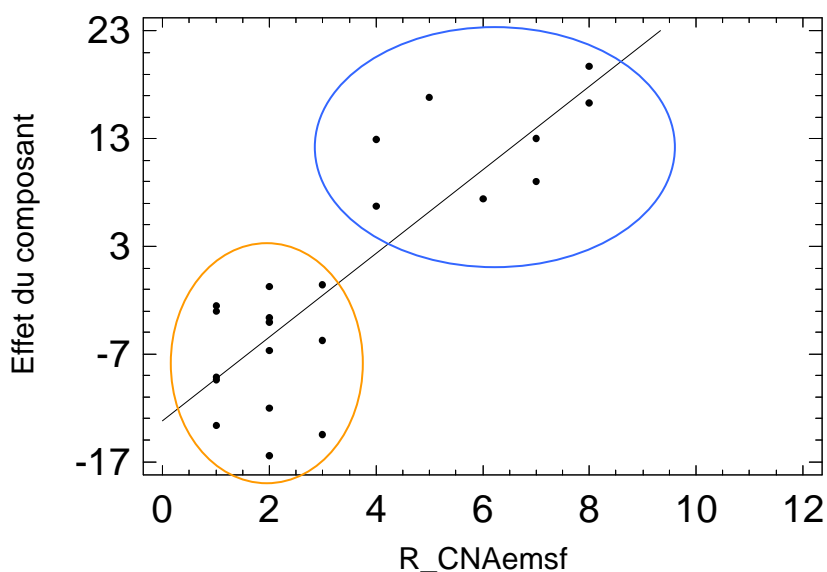


Fig. 20 : Régression multiple des individus du lot R (PJ-06-10 de Chausey).  
 $\text{Phago} = -596,6 - 0,00001 \cdot \text{THC} + 3,8 \cdot \text{CNAemsf} - 0,8 \cdot \text{CNAVt} + 4,4 \cdot \text{ratio} + 6,3 \cdot \text{viab.}$   
 $R^2 = 78,1\%$ . Cercle orange : animaux en bon état de santé ; cercle bleu animaux en état de santé dégradé.

En effet, la viabilité cellulaire est signe du bon état de santé des cellules de l'hémolymphe. Dans notre étude, ses valeurs les plus élevées sont négativement corrélées au pourcentage de cellules non adhérees en EMSF. En effet, au dessus d'une viabilité de 97%, la majorité des individus montre un pourcentage de cellules non adhérees inférieur à 4%.

Enfin, une phagocytose supérieure à 25% est liée à de faibles pourcentages de cellules non adhérees en EMSF <4%.

Les résultats obtenus pour le lot S montrent les mêmes tendances que les trois corrélations précédemment décrites pour le lot R. Par contre, le niveau du pourcentage de cellules non adhérees en EMSF est supérieur à celui du lot R. Sa limite est fixée à 6%.

Le pourcentage de cellules de l'hémolymphe non adhérees en EMSF semble être un bon critère sur l'état de santé de base des palourdes. Le test d'adhérence a donc été choisi pour sélectionner des nouveaux géniteurs qui serviront lors des pontes contrôlées.



### 3- Sélection de géniteurs par analyses de paramètres hématocytaires sur des géniteurs de Landéda (avril 2009)

Afin de tenter de sélectionner des géniteurs, des analyses supplémentaires ont été entreprises sur les lots de Landéda. Le site est situé beaucoup plus près du laboratoire. Ainsi, les échantillons d'hémolymphe ont été prélevés au laboratoire pour éviter un problème de transport sur les échantillons. Les palourdes avaient largement grandi par rapport aux premières expérimentations. Les palourdes avaient alors 3 ans d'âge et atteignaient une taille propice à la reproduction (>38 mm).

Les analyses physiologiques sur 50 individus de chacun des deux lots R et S ont été menées sur deux jours (25 individus de chaque lot le 1<sup>er</sup> jour et 25 individus de chaque lot le 2<sup>eme</sup> jour ; nombre total de palourdes = 100).

#### 3-1 Résultats généraux sur les paramètres hématocytaires

Globalement, le tableau 9 indique les différences les plus marquées entre les lots R et S des palourdes récoltées sur Landéda en avril 2009 de la concentration en oxyde nitrique après le contact avec *V. tapetis*, de la production d'oxyde nitrique, du ratio d'adhérence et de l'activité de la phénol-oxydase. De nombreuses corrélations ont été obtenues entre la THC et les paramètres de l'oxyde nitrique, le ratio d'adhérence et la viabilité pour les deux lots R et S (Tab. 10). Les plus fortes corrélations obtenues dans les deux lots apparaissent entre les concentrations en NO après un contact avec *V. tapetis* et la production totale ( $r^2=0.95$ ). Ceci confirme bien que la bactérie entraîne une production de NO dans l'hémolymphe des palourdes (Jeffroy et Paillard, 2011). De plus, à nouveau une corrélation entre le ratio d'adhérence et la THC est observée. ( $r^2 = 0.58$  et  $0.62$  pour le lot R et S respectivement). Cependant, une analyse séparée s'avère utile afin de confirmer ou non les tendances globales obtenues dans le tableau 10 car les résultats ont été obtenus sur deux jours d'expérimentation.

Tab. 9 : Moyenne des paramètres physiologiques analysés sur les individus des lots R et S de Landéda (avril 2009). Taille de la coquille (mm) ; [THC] concentration totale en hémocytes cellules.ml<sup>-1</sup>, viabilité en % de cellules vivantes, Phago= activité phagocytaire en % de cellules phagocytaires, NO EMSF et NO Vt concentration en μM d'oxyde nitrique (NO) en condition basale en eau de mer stérile filtrée EMSF et en contact avec *Vibrio tapetis* (Vt), production de NO entre les deux conditions EMSF et Vt, pourcentage de cellules non adhérees en EMSF et avec *V. tapetis*, ratio d'adhérence, concentration de protéines du plasma de l'hémolymphe en, mg.ml<sup>-1</sup> et activité de la phénoloxydase PO en U.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>.

	R	S
Taille coquille	38,5 (+/-0,9)	39,4 (+/-0,8)
[THC] x10 <sup>5</sup>	5,2 (+/- 1,4)	4,3 (+/-0,9)
Viabilité	89,5 (+/-1,6)	87,4 (+/-2,5)
Phago	26,6 (+/-2,9)	28,3 (+/-4,6)
NO EMSF	1,7 (+/-0,3)	1,3 (+/-0,3)
NO Vt	5,3 (+/-1,1)	2,9 (+/-0,7)
Prod NO	3,5 (+/-1,2)	1,7 (+/-0,6)
Cellules décollées EM	1,1 (+/-0,1)	1,6 (+/-0,3)
Cellules décollées + Vt	4,8 (+/-0,6)	4,4 (+/-0,7)
Ratio adhérence	5,5 (+/-1,2)	3,5 (+/-0,6)
[Proteines] plasma	0,239 (+/-0,012)	0,255 (+/-0,021)
Activité PO plasma	9,2 (+/-1,6)	14,3 (+/-3,3)

Tab. 10: Coefficients de corrélation entre les paramètres hématologiques pour les lots R et S de Landéda (avril 2009). \* indique une corrélation significative pour P<0.05. CNA : pourcentage de cellules non adhérentes en eau de mer stérile filtrée (EMSF) et après 3h de contact avec *V. tapetis* (Vt).

		R						
	Viabilité	CNA EMSF	CNA Vt	Ratio	Phagocytose	NO EMSF	NO Vt	NO production
THC	<b>0,28 *</b>	0,13	(-)0,12	<b>0,58 *</b>	0	<b>0,32 *</b>	<b>0,29 *</b>	0,21
Viabilité		0,12	(-)0,02	<b>0,30 *</b>	<b>0,49 *</b>	0,09	0,11	0,15
CNA EMSF			<b>0,58 *</b>	<b>0,36 *</b>	<b>0,49 *</b>	<b>0,27 *</b>	<b>0,32 *</b>	<b>0,25 *</b>
CNA Vt				0,1	<b>0,35 *</b>	0,15	0,11	0,07
Ratio					<b>0,33 *</b>	<b>0,32 *</b>	<b>0,42 *</b>	<b>0,34 *</b>
Phagocytose						0,13	<b>0,32 *</b>	<b>0,3 *</b>
NO EMSF							<b>0,34 *</b>	0,02
NO Vt								<b>0,95 *</b>
		S						
THC	<b>0,31 *</b>	<b>(-)0,44 *</b>	(-)0,02	<b>0,61 *</b>	(-)0,04	<b>0,33 *</b>	<b>0,34 *</b>	0,24
Viabilité		<b>(-)0,32 *</b>	(-)0,04	<b>0,31 *</b>	0,02	(-)0,01	(-)0,03	(-)0,03
CNA EMSF			<b>0,36 *</b>	<b>(-)0,54 *</b>	0,25	(-)0,20	(-)0,13	(-)0,05
CNA Vt				<b>0,33 *</b>	<b>0,40 *</b>	0,03	0,2	0,23
Ratio					0,03	0,03	<b>0,35 *</b>	<b>0,25 *</b>
Phagocytose						(-)0,06	<b>0,24 *</b>	<b>0,31 *</b>
NO EMSF							<b>0,55 *</b>	0,16
NO Vt								<b>0,91 *</b>

### 3-2 Résultats par jour de prélèvement d'hémolymphe

La taille moyenne des coquilles de palourdes ne montre pas de différence entre les deux lots (Tableau 11). Cependant, les animaux du lot S sont significativement un peu plus grands dans l'échantillonnage du deuxième jour ( $p=0.0003$ ).

Les concentrations hémoctaires ne montrent pas de différence significative entre les deux lots ni entre les deux jours de prélèvement. Par contre, une différence apparaît le deuxième jour de prélèvement sur la viabilité cellulaire. La viabilité cellulaire a augmenté pour le lot R alors qu'elle a diminué pour le lot S passant respectivement de 86.5% à 92.6% et de 88.9% à 85.9%. Ces viabilités restent d'un niveau correct par rapport aux prélèvements précédent. L'activité phagocytaire donne des valeurs globales identiques de l'ordre de 27%. Par contre, la phagocytose est 4 fois plus élevée entre les deux jours d'expérience pour les deux lots augmentant de 10% à 40%.

Une différence du ratio de l'adhérence est observée entre les deux lots d'une part à cause de l'augmentation des cellules non adhérentes en EMSF et avec *V. tapetis* dans le lot S et la diminution des cellules non adhérentes en EMSF pour le lot R au cours du deuxième jour d'expérimentation. Une fois encore, un pourcentage de cellules non adhérentes en EMSF plus faible est corrélé à l'augmentation de la viabilité. C'est le cas pour le lot R.

Pour les deux jours d'analyses, la concentration en oxyde nitrique est significativement supérieure après le contact avec la solution bactérienne par rapport à la concentration basale en EMSF : la concentration de NO triple pour le lot R et double pour le lot S. La production de NO atteint 3.5 $\mu$ M pour le lot R et 1.7 $\mu$ M pour le lot S (Tab.9). Cependant, lorsque les résultats sont détaillés par jour d'expérience, nous observons une augmentation des concentrations et de production de NO au deuxième jour pour les deux lots.

La concentration en protéines totales du plasma diminue significativement le deuxième jour pour le lot S. Cette importante diminution le deuxième jour pour le lot S explique la valeur de l'activité PO plus élevée du lot S dans le tableau global.

L'activité PO augmente significativement le deuxième jour pour le lot S ( $p=0.0000$ ).

Tab. 11 : Paramètres physiologiques sur deux jours d'analyse sur les individus des lots R et S de Landéda: Taille de la coquille (mm ;. [THC] concentration totale en hémocytes cellules.ml<sup>-1</sup>, viabilité en % de cellules vivantes, Phago : activité phagocytaire en % de cellules phagocytaires, NO EMSF et NO Vt concentration en μM d'oxyde nitrique (NO) en condition basale en eau de mer stérile filtrée EMSF et en contact avec *Vibrio tapetis* (Vt), production de NO entre les deux conditions EMSF et Vt, pourcentage de cellules non adhérentes en EMSF et avec *V. tapetis*, ratio d'adhérence, concentration de protéines du plasma de l'hémolymphe en, mg.ml<sup>-1</sup> et activité de la phénoloxydase PO en U.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>.  
\* : différence significative entre les deux jours au sein d'un lot.

Paramètre hémocytaire	08-avr-09	09-avr-09	08-avr-09	09-avr-09
	Lot R (PJ-06-10)		Lot S (PJ-06-7)	
Taille coquille	38,1 (+/-0,9)	38,5 (+/- 0,7)	39,4 (+/- 1,3)	40,8 (+/- 0,8)
[THC] x10 <sup>5</sup>	4,4 (+/- 1,5)	6,1 (+/- 2)	4,7 (+/-1,5)	3,9 (+/-0,9)
Viabilité	86,5 (+/- 3,9)	92,7 (+/- 2,2) *	88,9 (+/-3,0)	85,8 (+/- 4,0)
Phago	13,4 (+/- 2,4)	40,5 (+/- 4,1) *	15,7 (+/- 1,7)	41,0 (+/- 5,7) *
NO EMSF	1,4 (+/- 0,4)	2,0 (+/- 0,4)	1,3 (+/- 0,4)	1,2 (+/-0,4)
NO Vt	3,8 (+/- 0,7)	6,9 (+/-1,6) *	2,2 (+/-0,6)	3,6 (+/-1,2)
Prod NO	2,3 (+/-0,4)	4,8 (+/-1,7) *	0,9 (+/-0,3)	2,4 (+/-1,1) *
Cellules décollées EM	1,3 (+/-0,3)	0,9 (+/-0,2)	1,0 (+/-0,3)	2,1 (+/-0,4) *
Cellules décollées + Vt	4,4 (+/-1,1)	5,1 (+/-0,9)	3,3 (+/-0,8)	5,6 (+/-0,8) *
Ratio adhérence	4,0 (+/-0,8)	7,1 (+/-1,7) *	3,7 (+/-1,0)	3,3 (+/-0,7)
[Proteines] plasma	0,263 (+/-0,038)	0,216 (+/-0,018)	0,306 (+/-0,026)	0,205 (+/-0,021) *
Activité PO plasma	9,0 (+/-1,9)	9,5 (+/-2,3)	9,7 (+/-1,7)	18,9 (+/-6,0) *

## Conclusion

Les différences les plus significatives sont au sein d'un même lot mais sur les deux jours d'analyses expérimentales.

Le pourcentage de cellules décollées en EMSF est faible et le ratio est élevé pour les deux lots.

L'échantillonnage semble beaucoup influencer sur les résultats. Il y a un effet date de prélèvement pour les deux lots sur la phagocytose et pour la production de NO pour les deux lots R et S.

Globalement, entre les deux jours, la phagocytose et la concentration en NO ont augmenté et la concentration en protéines a diminué pour les deux lots. De plus, l'activité PO a augmenté pour le lot S et le ratio a diminué pour le lot R. La variabilité interindividuelle était déjà bien connue mais il s'avère que les paramètres peuvent varier d'un jour à l'autre compliquant le choix des tests pour des sélections de géniteurs.

Hurtado et collaborateurs (2011) ont montré sur deux jours d'acclimatation au laboratoire de palourdes européennes *R. decussatus* une diminution de la THC, une diminution de phagocytose et une augmentation du pourcentage de cellules mortes par rapport à des échantillons prélevés sur le terrain et placés sur glace avant analyse. Par contre, après 7 jours d'acclimatation, l'effet inverse a été observé c'est à dire une diminution du pourcentage de cellules mortes, une augmentation de la phagocytose et une augmentation de la THC. De plus, les tests effectués sur des huîtres *C. gigas* en parallèle ne montraient pas les mêmes tendances que celles des palourdes. Ces auteurs supposent que les différents habitats de ces deux bivalves (épifaune et infaune) pourraient être mis en cause dans le comportement hémocytaire lors de l'acclimatation. La conservation des palourdes en eau perturberait leur physiologie car ces animaux vivent enfouis dans le sédiment en milieu naturel.

#### 4- Effet du prélèvement de l'hémolymphe sur le développement de la MAB de l'île Tudy.

La dernière sélection de géniteurs pour effectuer des reproductions a été réalisée sur des palourdes provenant de l'île Tudy. Au cours de cette expérience nous avons voulu montrer sur des animaux conservés vivants, si le prélèvement de l'hémolymphe effectué par ponction avait un effet sur les paramètres hématocytaires et sur le développement de la MAB.

##### 4-1 Schéma expérimental

Les palourdes proviennent de l'étang de la Station SATMAR de l'île Tudy considéré comme site à très faible prévalence de la MAB. Cent vingt palourdes ( $46.9\text{mm} \pm 0.7$ ) ont été réparties en 4 conditions (Fig. 40). 60 individus ont été ponctionnés une première fois (T0) sur le site de la station, numérotés de 1 à 60 puis replacés sur le terrain jusqu'à l'étape suivante 1 mois plus tard. Le volume de l'hémolymphe prélevée est limité à  $450\mu\text{l}$  pour ne pas affaiblir les animaux. Ce prélèvement permet d'analyser l'état physiologique sur l'hémolymphe à l'état basal par les mesures de la THC, la viabilité des hématocytes, le test d'adhérence, le dosage de l'oxyde nitrique, l'activité PO et les génotypes des microsatellites.

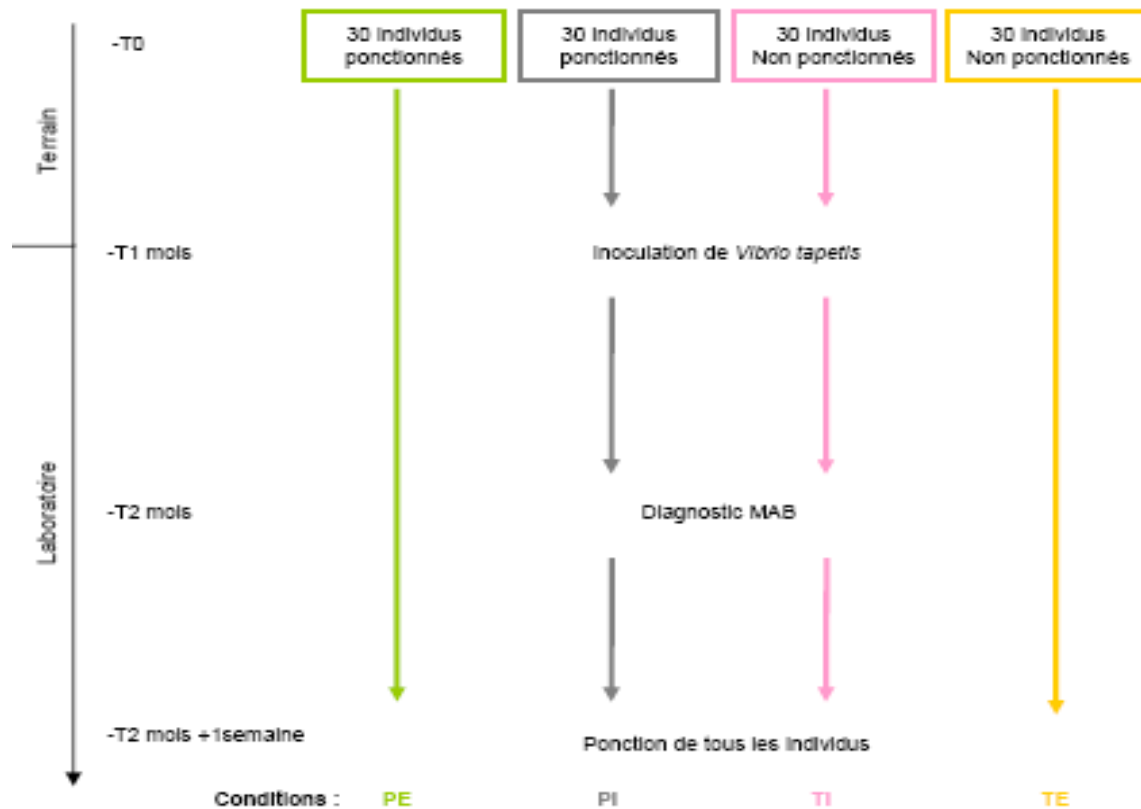


Fig. 21: Schéma expérimental pour l'étude de l'effet du prélèvement de l'hémolymphe sur le développement de la MAB.

#### 4-2 Etat physiologique hémocytaire de base des animaux :

Des mesures sur la concentration hémocytaire, la viabilité, la production du NO, l'activité de la PO, l'adhérence ont été entreprises au début de l'expérimentation (Tab. 19).

Les individus de même taille moyenne montrent entre les 30 premiers individus et les 30 suivants une moyenne de la THC légèrement inférieure, une moyenne de la viabilité inférieure, un pourcentage de CNA supérieure et un pourcentage de CNA avec *V. tapetis* supérieure.



Tab. 12: Moyenne et erreur standard des paramètres de l'hémolymphe au premier prélèvement. [THC] concentration totale en hémocytes  $\text{cellules.ml}^{-1}$ , viabilité en % de cellules vivantes, Phago= activité phagocytaire en % de cellules phagocytaires, NO EMSF et NO Vt concentration en  $\mu\text{M}$  d'oxyde nitrique (NO) en condition basale en eau de mer stérile filtrée EMSF et en contact avec *Vibrio tapetis* (Vt), production de NO entre les deux conditions EMSF et Vt, pourcentage de cellules non adhérentes en EMSF et avec *V. tapetis*, ratio d'adhérence, concentration de protéines du plasma de l'hémolymphe en,  $\text{mg.ml}^{-1}$  et activité de la phénoloxydase PO en  $\text{U.min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$ .

Paramètres physiologiques	Moyenne et erreur standard	moyenne des individus n°1 à n°30	moyenne des individus n°31 à n°60
THC $\times 10^5$	6.7 +/- 1.1	6.5 +/- 1.5	6.9 +/- 1.7
Viabilité	71,3 +/- 1,8	68,7 +/- 2,4	74,3 +/- 2,3
CNA (EMSF)	10,3 +/- 1,5	17,1 +/- 2,5	8,6 +/- 2,0
CNA ( <i>V.tapetis</i> )	29,7 +/- 4,4	41,8 +/- 8,7	23,6 +/- 4,3
Ratio adhérence	3,2 +/- 0,4	3 +/- 0,5	3,3 +/- 0,6
NO (SSW)	4,5 +/- 0,4	4,6 +/- 0,5	4,5 +/- 0,5
NO ( <i>V.tapetis</i> )	4,9 +/- 0,4	3,9 +/- 0,6	5,1 +/- 0,7
NO production	1,2 +/- 0,5	0,7 +/- 0,8	1,6 +/- 0,5
Protéines	0,221 +/- 0,017	0,218 +/- 0,023	0,225 +/- 0,025
PO	0,75 +/- 0,10	0,83 +/- 0,16	0,67 +/- 0,13

## THC

La concentration hémocytaire sur l'ensemble des 60 individus est de  $6.7 \times 10^5$   $\text{cell.ml}^{-1}$ . Aucune différence de concentration hémocytaire n'est observée entre la moyenne des trente premiers individus et la moyenne des trente suivants.

## Viabilité

La viabilité des hémocytes est variable avec quelques fortes mortalités pour certains échantillons. Elle se situe entre 54.2% à 86.9% de cellules vivantes pour une moyenne de 71.5% +/-1.8. La viabilité des hémocytes des trente premiers individus est significativement plus faible que celle des trente individus suivants ( $p = 0.0485$ ).

## **Adhérence**

L'hémolymphe prélevée sur le terrain avait immédiatement été incorporée dans les puits de plaque de culture 24 puits dans 200µL d'EMSF en attendant le début de l'incubation avec la solution bactérienne de *V. tapetis* au laboratoire. A la suite de l'incubation de 3 h à 18°C, les proportions d'hémocytes non adhérents avec ou sans *V. tapetis* montrent des valeurs assez importantes. Les valeurs moyennes des cellules non adhérentes dans l'EMSF seule et celles en contact avec la solution bactérienne sont de 10.3% +/-1.5 et de 29.7% +/-4.4 respectivement. Une forte induction du décollement hémocytaire est observée par la présence du *V. tapetis*.

Lorsque l'on analyse les résultats individuellement, des décollements par le *V. tapetis* sont presque maximums lorsque le décollement des hémocytes était déjà très élevé en EMSF.

Les ratios Vt/EMSF obtenus donnent des valeurs variables entre 0.7 et 7.0 et une moyenne de 3.2 +/-0.4. Aucune corrélation n'a été observée entre les cellules non adhérentes et la viabilité. Alors que de fortes corrélations négatives existent entre la THC et les cellules non adhérentes en EMSF et après contact avec le *V. tapetis* (-0.42 et -0.47 respectivement).

## **Concentration et production de NO :**

Les concentrations en NO ne diffèrent significativement ni entre les deux conditions EMSF et Vt ni entre les 60 individus. Près des deux tiers des individus ont produit davantage de NO en présence de *V. tapetis*. Alors qu'une diminution ou une stabilité est observée pour le reste des individus. Les quelques valeurs négatives de production de NO découlent de la variabilité au niveau de la réponse cellulaire entre les individus suite à l'ajout de la bactérie.

## **Concentration protéique du plasma de l'hémolymphe**

La concentration moyenne des protéines totales du plasma de l'hémolymphe est de 0.221mg.ml<sup>-1</sup> (+/- 0.019) et aucune différence n'est observée entre les deux séries de 30 palourdes.

## Activité de la PO

L'activité de la PO est particulièrement basse dans le plasma des palourdes de l'île Tudy. En effet, les valeurs n'atteignent pas  $2 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protéines. Cependant, une grande variabilité entre les individus est observée.

### 4-3 Influence du prélèvement d'hémolymphe sur la physiologie des palourdes

Un mois plus tard, l'ensemble des 120 palourdes a été récolté et stocké en eau au laboratoire. Ce laps de temps est nécessaire au rétablissement des animaux suite à la ponction d'hémolymphe. Ford et Paillard, 2007 ont montré qu'une répétition de prélèvement de 200  $\mu\text{l}$  d'hémolymphe sur le terrain n'a pas d'impact sur des paramètres hématocytaires telle que la concentration cellulaire de l'hémolymphe.

Sur ces 120 palourdes, 30 ponctionnées et 30 non ponctionnées ont subi une inoculation par *V. tapetis*. Les 60 palourdes restantes servent de témoins non inoculées. Comme précisé dans la section « matériel et méthodes », les palourdes sont inoculées par *V. tapetis* et sont incubées durant 4 semaines. Au terme de l'incubation les palourdes ont été anesthésiées par une solution au  $\text{MgCl}_2$  5%. Le manteau a été délicatement décollé afin d'observer à la loupe binoculaire la présence et l'intensité du dépôt de conchyoline et de la recalcification. Puis, une semaine plus tard, un prélèvement d'hémolymphe a été effectué pour analyser les paramètres hématocytaires.

#### 4-3-1 Paramètres hématocytaires

La concentration hématocytaire est restée stable au cours de l'expérimentation sauf pour la condition des animaux ponctionnés puis incubés par *V. tapetis*. La viabilité des cellules hématocytaires lors de ce prélèvement est plus élevée dans l'ensemble des quatre conditions. Cependant, les viabilités sont en dessous de 90% pour les individus ayant subi l'incubation avec la bactérie.

Les résultats des tests *in vitro* d'adhérence diffèrent significativement entre les dates de prélèvement (Tab. 14). En effet, une forte diminution du nombre de cellules non adhérentes est observée entre la première ponction et la deuxième ponction (PE) que ce soit pour l'hémolymphe en EMSF ou inoculés par *V. tapetis*. De plus, le nombre de cellules décollées en EMSF pour les trois autres conditions (PI, TI et TE) est relativement élevé (>4%). Pour chacune des quatre conditions, *V. tapetis* a induit *in vitro* une augmentation du nombre de cellules décollées (Tab. 13 et 14).

Une différence significative apparaît sur la concentration de NO dosé dans l'hémolymphe. De fortes concentrations sont observées dans les palourdes ayant connu la ponction sur le terrain, conditions PE et TE, avec des valeurs de NO de l'ordre de 100 $\mu$ M et de 22 $\mu$ M respectivement (Tab. 13). Ces fortes valeurs pourraient être néfastes aux individus puisque le NO devient toxique lorsqu'il est trop concentré dans les cellules. Cependant, dans la partie « Cas du NO » (p.110), les palourdes résistent à ces fortes concentrations et arrivent à retrouver un état de base. Ces valeurs, bien qu'étant très fortes, ont déjà été décrites chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (Novas *et al.*, 2004) et l'huître *Crassostrea virginica* (Villamil *et al.*, 2007).

Les concentrations en protéines varient peu entre les conditions. Cependant une baisse à 0.177 mg.ml<sup>-1</sup> est notée pour la condition PI. Cette condition est celle pour laquelle les animaux ont connu le plus de stress (ponction d'hémolymphe et inoculation de bactérie). Par contre une différence entre les activités de la PO est obtenue entre les conditions avec les valeurs les plus faibles pour les témoins.

Tab. 13: Moyenne et erreur standard des paramètres de l'hémolymphe sur les quatre conditions (TE : animaux non ponctionnés et non inoculés, PE : animaux ponctionnés et non inoculés, TI : animaux non ponctionnés mais inoculés, PI : animaux ponctionnés et inoculés). [THC] concentration totale en hémocytes  $\text{cell.ml}^{-1}$ , viabilité en % de cellules vivantes, Phago= activité phagocytaire en % de cellules phagocytaires, NO EMSF et NO Vt concentration en  $\mu\text{M}$  d'oxyde nitrique (NO) en condition basale en eau de mer stérile filtrée EMSF et en contact avec *Vibrio tapetis* (Vt), production de NO entre les deux conditions EMSF et Vt, pourcentage de cellules non adhérentes en EMSF et avec *V. tapetis*, ratio d'adhérence, concentration de protéines du plasma de l'hémolymphe en  $\text{mg.ml}^{-1}$  et activité de la phénoloxydase PO en  $\text{U.min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$ ; MAB : stade moyen de dépôt de conchyoline; RAB : stade moyen de réparation/ coquillière ; /: MAB et RAB non mesurés.

	PE (n=26)	PI (n=25)	TI (n=25)	TE (n=30)
THC $\times 10^5$ ( $\text{cell.ml}^{-1}$ )	6.9 +/- 1.3	15.6 +/- 4.5	5.7 +/- 1.5	7.5 +/- 1.6
Viability (%)	92,4 +/- 2,1	86,1 +/- 5,4	81,0 +/- 7,4	91,9 +/- 3,6
Non adherent cells (SSW) (%)	2,7 +/- 1,2	8,6 +/- 2,1	4,2 +/- 1,4	6,0 +/- 2,3
Non adherent cells ( <i>V. tapetis</i> ) (%)	6,2 +/- 2,1	20,1 +/- 4,5	7,3 +/- 2,5	8,4 +/- 3,0
Ratio adherence	5,1 +/- 3,1	2,7 +/- 0,7	1,5 +/- 0,3	2,6 +/- 1,9
NO (SSW) ( $\mu\text{M}$ )	98,3 +/- 5,7	22,2 +/- 1,9	6,5 +/- 1,4	2,6 +/- 0,8
NO ( <i>V. tapetis</i> ) ( $\mu\text{M}$ )	100,7 +/- 4,7	22,3 +/- 1,9	6,6 +/- 1,2	2,8 +/- 0,9
NO production	2,2 +/- 3,9	1,2 +/- 2,1	1,4 +/- 2,1	0,0 +/- 0,7
Proteins ( $\text{mg.ml}^{-1}$ )	0,234 +/- 0,025	0,177 +/- 0,019	0,289 +/- 0,021	0,226 +/- 0,026
PO activity ( $\text{U.min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$ )	1,2 +/- 0,2	1,4 +/- 0,3	0,8 +/- 0,2	0,8 +/- 0,2
MAB	/	1,5 +/- 0,4	1,3 +/- 0,5	/
stade M0	/	33,3	38	/
stade M1	/	4,2	19	/
stade M2	/	45,8	15	/
stade M3	/	16,7	20	/
RAB	/	2,4 +/- 0,1	2,5 +/- 0,1	/
Healthy	/	12,1	16	/
stade R2	/	16,7	20	/
stade R2,5	/	41,7	44	/
stade R3	/	29,2	20	/

Tab. 14: Analyses statistiques de l'effet de la date d'expérimentation, de la ponction d'hémolymphe P et de l'inoculation bactérienne I sur les paramètres hématocytaires. \* indique un effet significative à  $p < 0.01$  ; ns=effet non significatif. (nombre de palourdes par condition=30).

	Effect			
	Date	Puncture	Inoculation	P x I
THC	ns	ns	ns	*
Viability	*	ns	*	*
Non adherent cells (SSW)	*	ns	ns	ns
Non adherent cells ( <i>V. tapetis</i> )	*	ns	ns	*
Ratio adherence	*	ns	ns	ns
NO (SSW)	*	*	*	*
NO ( <i>V. tapetis</i> )	*	*	*	*
NO production	ns	ns	ns	ns
Proteins	ns	ns	*	*
PO activity	*	*	ns	*

#### 4-3-2 Développement de la maladie et réparation coquillière

Suite à l'incubation de 4 semaines après l'inoculation par *V. tapetis*, les stades de maladie de l'anneau brun (M1 à M3) et les stades de réparation coquillière (R3 à R2) ont été diagnostiqués. La figure 22 montre la différence obtenue entre les deux conditions TI et PI sur le développement de la MAB. Le pourcentage de palourdes de la condition TI saines et en faible stade de maladie (M1) est supérieur à celui de la condition PI (58% et 39% respectivement). A l'inverse, le nombre de palourdes en stades avancés (M2 et M3) de la condition TI est inférieur à celui de la condition PI (42% et 61% respectivement).

La ponction semblerait augmenter le développement de la MAB.

D'autre part, la guérison est supérieure pour les animaux de la condition TI (Fig. 23). Pour chacun des stades d'individus sains, totalement réparés (R3)

et fortement réparés (R2.5), le pourcentage d'individus est supérieur dans la condition TI à celui de la condition PI (80% et 70% respectivement).

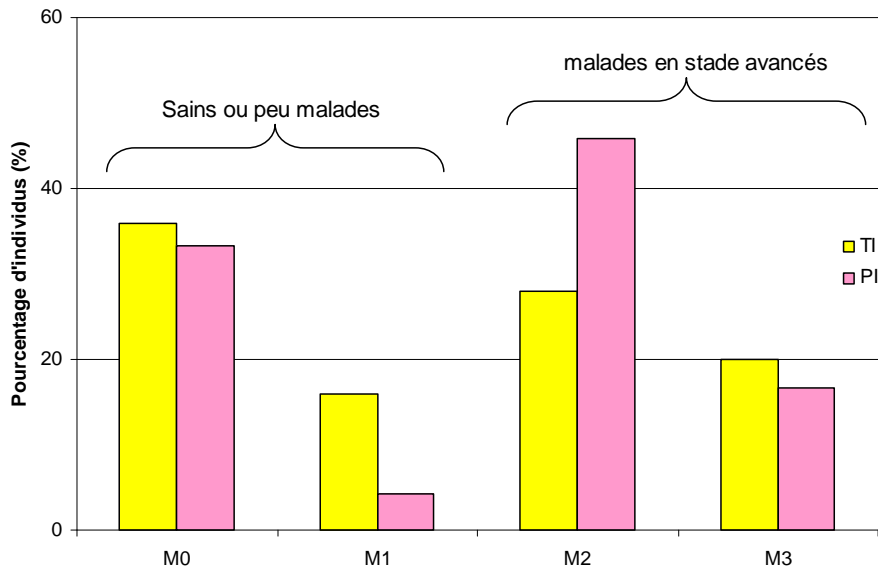


Fig. 22: Proportion des stades de maladie des individus non ponctionnés (TI) et ponctionnés (PI) après inoculation par *V. tapetis*.

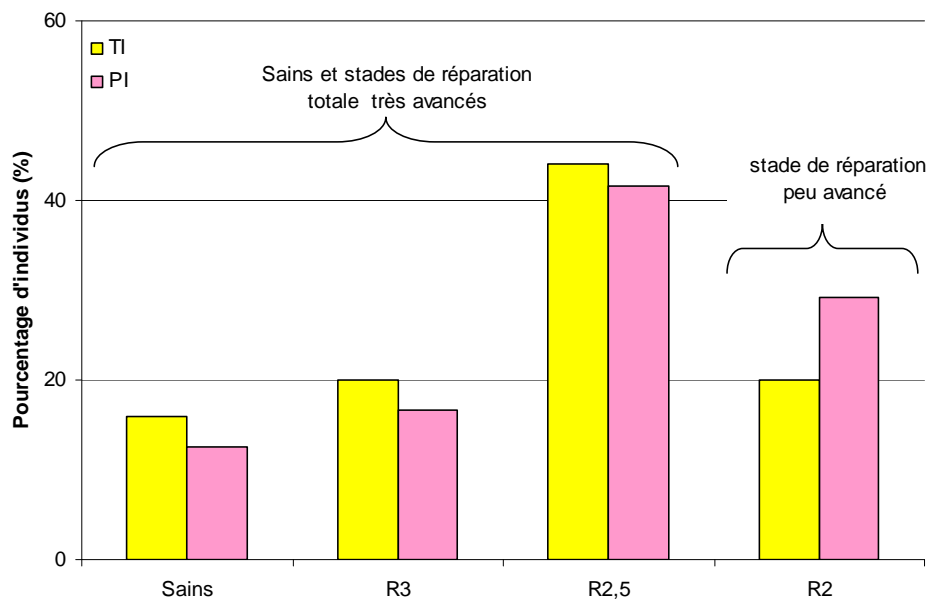


Fig. 23: Proportion des stades de réparation des individus non ponctionnés (TI) et ponctionnés (PI) après inoculation par *V. tapetis*.

#### 4-3-3 Cas du NO

Les animaux témoins ont donné des valeurs de NO les plus faibles et de l'ordre de celles obtenues au départ de l'expérimentation (5 $\mu$ M). Ces animaux avaient été les seuls à être entretenus dans un bac en eau renouvelée (Fig. 24 et Tab. 13). Une étude supplémentaire a suivi cette expérimentation. L'hypothèse était que la conservation des palourdes en bac en eau non renouvelée (ENR) a une influence sur la production de NO dans l'hémolymphe.

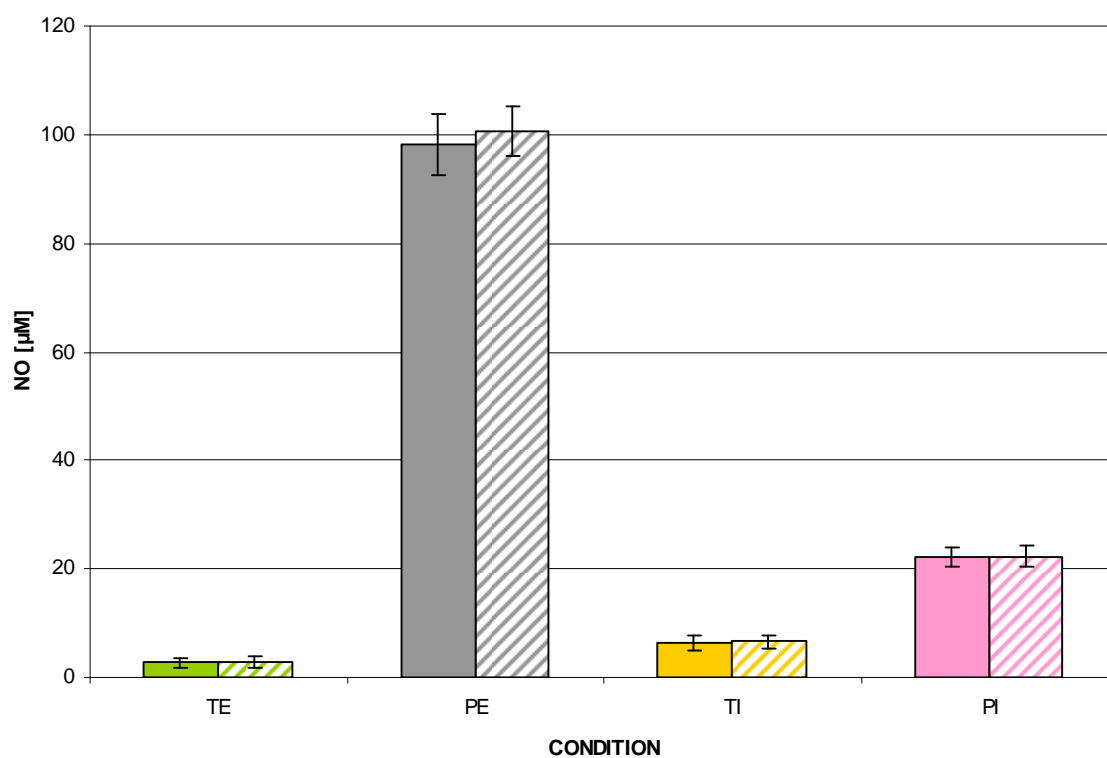


Fig. 24: Concentration moyenne d'Oxyde Nitrique (NO) en  $\mu$ M des individus des quatre conditions (TE : animaux non ponctionnés et non inoculés, PE : animaux ponctionnés et non inoculés, TI : animaux non ponctionnés mais inoculés, PI : animaux ponctionnés et inoculés). Barres pleines : en condition EMSF, barres rayées : en contact avec *V. tapetis*.

Les animaux de l'expérimentation avaient été remis en eau renouvelée (ER) après la dernière ponction. Chaque individu a été prélevé pour un nouveau dosage de NO noté au temps T3. La concentration de NO des animaux de TE



a augmenté d'un facteur 5 entre le prélèvement au temps T2 et celui du temps T3 (Fig. 25). Ceci montre que le prélèvement induit une augmentation du NO de l'hémolymphe.

Puis, une partie des palourdes a été remise en bac en eau non renouvelée et l'autre moitié est restée en eau renouvelée pour TE et PE. Après trois semaines supplémentaires, un autre dosage de NO a été effectué sur tous les individus noté au temps T4.

Les individus ayant été remis en ENR ont bien produit une quantité élevée de NO par rapport aux animaux restés en eau renouvelée ( $p < 0.00001$ ). En effet, la quantité de NO quadruple dans l'hémolymphe lorsque les animaux stagnent dans un bac avec de l'eau de mer uniquement (Fig. 25). Nous notons également que la concentration de NO continue à diminuer dans le temps en condition eau de mer renouvelée.

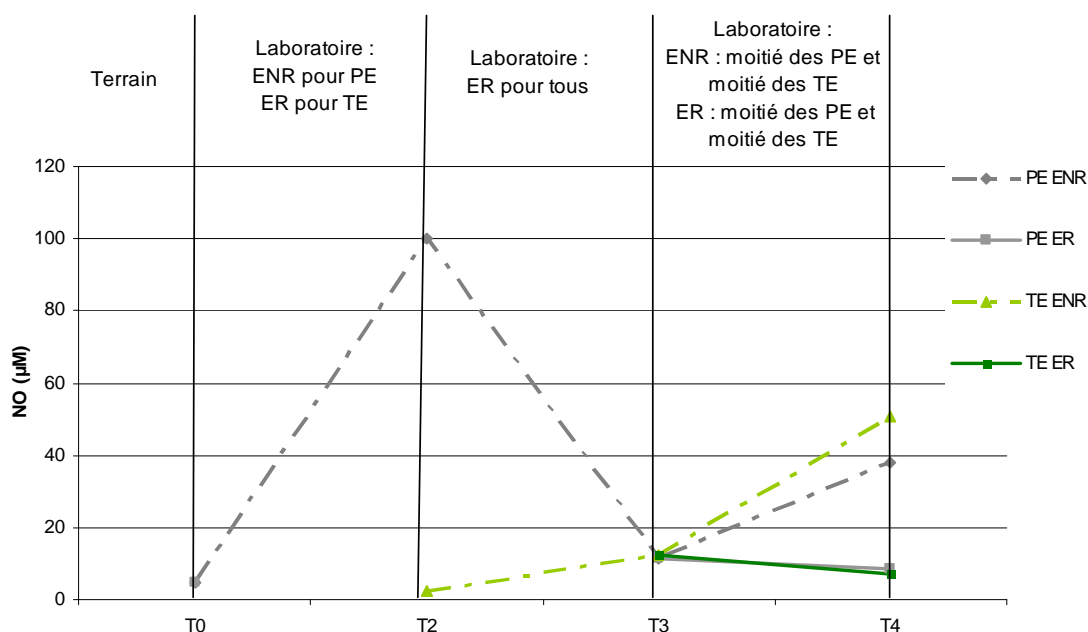


Fig. 25: Effet du prélèvement de l'hémolymphe et sur le conditionnement en eau renouvelée (ER) ou non renouvelée (ENR) sur la concentration de NO (µM).

## Conclusion

Contrairement aux résultats d'adhérence obtenus dans les manipulations précédentes, au temps T0 le décollement des hémocytes en EMSF est déjà très fort et le *V. tapetis* induit également un décollement important des cellules, ce qui induit un ratio élevé. Il y a eu, au cours de cette expérimentation, un impact important au niveau de l'adhésion des cellules.

La ponction d'hémolymphe a un « faible » impact sur le développement de la maladie.

La ponction sur le terrain induit une production de NO significativement supérieure à celle provoquée par l'inoculation de *V. tapetis*. Le contact de la bactérie a tout de même engendré une production de NO 4 fois supérieure à l'état de base mais 5 fois plus faible que la production de NO des individus uniquement ponctionnés à T0 (Fig. 24). Ces résultats suggèrent que les bactéries pourraient empêcher la production de NO grâce à des enzymes telles que des nitrates réductases.

Par contre au cours du test *in vitro*, la production de NO de l'hémolymphe de l'ordre de quelques  $\mu\text{M}$  apparaît très faible face au pic de productions obtenues pour les individus ayant subi préalablement une ponction de l'hémolymphe. Ces faibles valeurs de production du NO rappellent celles déjà obtenues lors des expériences réalisées au cours de la thèse (Jeffroy et Paillard, 2011).

Le conditionnement des palourdes influence fortement la concentration du NO de l'hémolymphe. Les animaux semblent être en meilleur état physiologique lorsqu'ils sont conditionnés en eau de mer renouvelée car la concentration en NO est faible. Cependant, le test standardisé d'inoculation de *V. tapetis* pour provoquer le développement des symptômes de la MAB se fait dans des aquariums en ENR depuis de nombreuses années. Les techniques de conditionnement des animaux en laboratoire seraient à revoir car leur état physiologique se dégrade très rapidement et d'autant plus lorsque des études physiologiques de l'immunité sont expérimentées sur les animaux conditionnés.

## 5-Discussion générale

Les paramètres hématocytaires (adhérence, production de NO, phagocytose) montrent des différences entre les géniteurs et pourraient être des marqueurs intéressants pour caractériser leur état physiologique. Les géniteurs répondant positivement à des stress tels que l'attaque d'agents pathogènes sont choisis préférentiellement pour les pontes. Cependant pour vérifier ces paramètres, le prélèvement de l'hémolymphe reste nécessaire. Malheureusement, il semblerait que le prélèvement de l'hémolymphe induirait davantage la MAB. Ceci n'est pas enthousiasmant pour la sélection de géniteurs et pour la production de familles. D'autre part, une forte proportion de géniteurs meurent rapidement ou n'émettent pas de gamètes même lorsqu'ils sont matures. Le développement gonadique est estimé à l'œil nu à l'écloserie de Leucate, mais les gamètes sont observés au microscope optique. Cependant, les palourdes témoins non ponctionnés produisent des gamètes. Les expérimentations semblent donc avoir un double effet négatif sur les événements de maturation et de ponte ainsi que sur l'état de santé des géniteurs.

En outre, des caractères de résistance sur la défense immunitaire ont été évalués individuellement. Une forte capacité de phagocytose des hématocytes de l'hémolymphe permet de faire davantage face à l'attaque à un agent pathogène. En effet, l'activité de phagocytose est plus faible chez les *R. philippinarum* de France ayant subi une inoculation par le *V. tapetis*, (entre 9 et 13%) comparée à *R. decussatus* (entre 17 et 23%) ou à *R. philippinarum* des Etats-Unis (17%) (Allam *et al.*, 2001). Ces populations américaines sont, par ailleurs, moins atteintes par le développement de la MAB après une inoculation. Notre étude suggère que les animaux montrant une activité phagocytaire supérieure à 25% auront plus de capacité de défense mais aussi que les animaux présentant des pourcentages de cellules non adhérentes <4% montreraient plus de capacités immunitaires.

En effet, nos résultats ont montré que la capacité d'adhérence des hématocytes de l'hémolymphe à l'état de base semble être un bon indicateur du potentiel de santé des animaux. Une capacité d'adhérence élevée en EMSF suggère un bon état de santé des hématocytes. De plus, la viabilité est

positivement corrélée à la THC qui semblent toutes deux être corrélées positivement à la capacité d'adhérence. Puisqu'une concentration plus élevée dans l'hémolymphe a été démontrée sur une durée de 14 jours après une inoculation de *V. tapetis* (Allam *et al.*, 2000), les concentrations les plus élevées obtenues dans notre étude ne peuvent pas être interprétées comme une éventuelle infection par *V. tapetis*. Par contre, Oubella *et al.* (1994) ont montré que la THC des individus malades en milieu naturel est plus faible. En outre, la THC de l'hémolymphe de palourdes du milieu naturel varie suivant les saisons et est plus faible de novembre à avril (Flye Sainte-Marie, 2009). Par ailleurs, suivant les lots de géniteurs (R ou S) la corrélation la capacité de phagocytose et l'état de base de la capacité d'adhérence des hémocytes n'existe pas à chaque expérimentation. Les processus de défense ne suivent pas les mêmes voies d'un individu à l'autre. Ceci montre la complexité des réactions existant chez individus des différents lots, suivant le site de culture et de la saison. De nouveaux tests de phagocytose pourraient améliorer nos interprétations en utilisant des *V. tapetis* GFP (cf. Thèse Mohamed Houmed Aboudaker, soutenance décembre 2011 ; Paillard, *comm pers*). En effet, les billes fluorescentes utilisées pour le test de phagocytose ne sont pas des particules spécifiques intervenant dans la MAB alors que la phagocytose de la bactérie *V. tapetis* serait hautement représentative de la défense immunitaire. Cependant, une corrélation entre plusieurs paramètres hémocytaires existe au sein des individus du lot R ce qui permettrait de sélectionner préférentiellement les palourdes de ce lot pour de futurs croisements. Comme l'avaient démontré Travers *et ses collaborateurs* (2008) sur l'ormeau face à *V. harveyi*, le profil hémolympatique des individus pourrait devenir un paramètre de santé et donc de meilleure défense face à une attaque par *V. tapetis* chez la palourde japonaise.

Allam *et al.*, 2000 ont montré des concentrations en protéines de l'hémolymphe plus faibles à partir de 28 jours d'incubation pour les individus inoculées par le *V. tapetis* par rapport aux individus témoins. De plus, Ford, 1986 suggère que les faibles concentrations en protéines des huîtres américaines infectées par le parasite *Haplosporidium* décrivent une altération des conditions physiologiques. Nous n'avons pas trouvé de différences

marquées entre les différentes expérimentations au cours des sélections de géniteurs.

D'autre part, les individus, montrant des valeurs des paramètres hématocytaires correspondant à un meilleur état de santé, sont peu nombreux. Ceci nécessite d'évaluer les paramètres hématocytaires d'un plus grand nombre de palourdes afin d'atteindre une quantité suffisante de géniteurs potentiels qui seraient choisis pour des croisements contrôlés et donc pour obtenir un maximum de familles biparentales. Par contre, après une inoculation, le diagnostic du développement de la MAB et de la réparation coquillière permet de discriminer un plus grand nombre de géniteurs. Néanmoins, cette forme de sélection nécessite de mettre en contact interne la bactérie avec les animaux, ce qui peut avoir un effet ultérieur sur les conditionnements en écloserie tel qu'un risque de contamination par la bactérie. En effet, la transmission de *V. tapetis* se fait principalement de manière horizontale mais lors des émissions de gamètes quelques bactéries pourraient se propager dans les écloséries. Néanmoins, l'eau des pontes de reproduction se situe autour de 27°C et cette température entraîne une décroissance très forte de *V. tapetis*.

L'activité de la PO mesurée au cours de deux expérimentations distinctes, 1- sur des palourdes récoltées à Landéda en avril 2009 et 2- sur des palourdes provenant de l'île Tudy au printemps 2010, n'a pas le même ordre de grandeur entre les deux expérimentations. En effet, l'activité de la PO sur les individus de Landéda est plus de 10 fois plus élevée en moyenne ( $10 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ ) que celle des palourdes de l'île Tudy ( $0.75 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ ). De plus, les concentrations en protéines ne sont pas mises en cause car elles sont identiques entre les deux expérimentations ( $0.22 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

Les études de Reid et collaborateurs (2003) ont permis de mettre en exergue l'impact de la salinité sur le niveau de phénol oxydase. En effet, les niveaux de PO sont plus élevés pour une salinité de 40‰ que pour une salinité de 20‰. Par ailleurs, récemment une étude a révélé qu'une activité antimicrobienne activait les réactions de la PO (Luna-Acosta *et al.*, 2011). Un effet du site et/ou de la période de récolte des animaux pourrait expliquer les différences des activités de la PO. En effet, les palourdes de l'île Tudy sont

soumises à des salinités fluctuantes pouvant être faibles lors de fortes précipitations ou à l'inverse élevées si les précipitations se font rares. D'autre part, Landéda est un site où la bactérie risque fortement d'être installée, c'est pourquoi une activité de la PO serait donc plus élevée dans ce site.

Il aurait été valorisant de traiter les différents biomarqueurs sur les hémocytes du fluide extrapalléal, lesquels sont directement en contact avec le site infectieux initial où se présente les dépôts de conchyoline. Toutefois, le fluide extrapalléal est plus difficile à prélever et sa ponction blesse également les animaux. De plus, la quantité de fluide extrapalléal pouvant être prélevé par individu (200 à 300µl) n'atteint pas le volume de l'hémolymphe (supérieur à 1 ml) et ne permet donc pas de tester plusieurs paramètres immunitaires simultanément.

Enfin, le conditionnement en laboratoire des palourdes en aquarium a un effet sur les paramètres hémocytaires des animaux. Il a été montré par Hurtado et ses collaborateurs (2011) que les animaux devraient être traités avant 48 heures. Malheureusement, le test d'inoculation se réalise sur une durée de plusieurs semaines afin d'observer une guérison qui est un caractère majeur dans la détermination d'une éventuelle résistance à la MAB.

Par contre, pour le suivi des paramètres immunitaires de palourdes du terrain (les tests *in vitro* pourraient être effectués plus rapidement tels que la capacité d'adhérence, la concentration en NO, la capacité de phagocytose), il serait indispensable d'apporter des machines pouvant être amenées sur le terrain.

Alors que chez les bivalves atteints par d'autres maladies, la sélection des géniteurs, pour l'obtention de familles, est effectuée essentiellement sur la survie des animaux, nous avons eu davantage de difficultés pour sélectionner les géniteurs au cours de notre étude. En effet, la MAB présente des symptômes graduels et induit très peu de mortalités. Ainsi, les géniteurs peuvent être diagnostiqués vivants après une inoculation de *V. tapetis*. Le fait que les animaux restent vivants alors qu'ils sont malades est un avantage pour les sélections puisqu'ils pourraient être utilisés pour les pontes selon leur état physiologique. Par contre, le désavantage au niveau expérimental est qu'il faille prélever du tissu ou du fluide et les incuber en laboratoire pour

pouvoir les sélectionner par la suite. En effet, ces prélèvements ont induit des mortalités ou des inhibitions de ponte.

L'état physiologique de base des palourdes peuvent être évaluée soit sur quelques paramètres de l'hémolymphe soit sur le diagnostic de la réparation coquillière mais dans les deux cas, les animaux auront subi un stress qui perturbe les reproductions.

Les sélections de palourdes pour obtenir des familles biparentales issues de géniteurs caractérisés comme résistants ou sensibles à la MAB restent difficiles et délicates.

**Chapitre 5 :**  
**Détermination de la parenté par un outil**  
**génétique et par un caractère phénotypique de**  
**la coquille**





## Introduction

Dans un premier temps, l'analyse génétique sur les différents microsatellites connus de la palourde japonaise a été réalisée sur les deux populations PJ-06-10 (dite résistante) et PJ-06-07 (dite sensible).

Par la suite, la production de familles à partir des géniteurs de ces populations caractérisés par leur capacité de défense face à la MAB a été effectuée afin d'enrichir nos connaissances sur les défenses immunitaires des palourdes japonaises sujettes à cette maladie. Plusieurs séries de croisements ont permis d'analyser un maximum de familles.

Les larves de quelques croisements n'ont pas survécu soit après la fécondation, soit avant et pendant la métamorphose. Le nombre de familles disponibles pour l'étude a donc été très réduit au nombre de sept.

Cependant, les familles s'étant correctement développées ont été semées sur des sites de cultures et leur parenté a été déterminée par l'outil microsatellite.

Par ailleurs, très rapidement, des regroupements de nombreuses palourdes à l'intérieur des lots de familles présentant les mêmes couleurs et mêmes ornements sur la coquille ont été réalisés. Les analyses microsatellites ont permis de mettre en évidence le lien entre les phénotypes ornementaux de la coquille et l'apparentement. Ce résultat a été mis en pratique par la suite pour les analyses des familles présentées dans le chapitre 6.

## 1- Détermination de la parenté par un outil génétique : microsatellite

1-1 Analyses microsatellites des deux populations : Lot PJ-06-07 et Lot PJ-06-10.

Les résultats de diversité alléliques sont indiqués dans le tableau de la communication présentée p.5. Le détail de la diversité alléliques des microsatellites effectuées sur la série de sélection de géniteurs est situé en annexe.

La détermination des génotypes sur plusieurs allèles des géniteurs a pour but de contrôler les reproductions. En effet, l'intérêt est de favoriser des croisements entre individus hétérozygotes pour certains loci car la diversité allélique est plus élevée et évite les allèles nuls. Les génotypes de la descendance sont prévisibles et les familles obtenues sont plus aisément identifiables.

Les résultats obtenus pour les deux lots étudiés montrent une diversité allélique des loci de microsatellites suffisante pour effectuer des croisements biparentaux. Ainsi, les familles produites peuvent être mélangées, évoluer en *commun garden* et être distinguées par la suite.

### 1-2 Croisements effectués

Le tableau 15 indique les différents croisements effectués en 2008 avec des géniteurs des lots PJ-06-10 (R) et PJ-06-07 (S) (cf. Chapitre 4 p.90). Au total, 16 familles biparentales ont été obtenues en 2008 jusqu'au stade larvaires D mais seules 7 familles de PJ-08-R1 et PJ-08-R2 ont atteint les stades de métamorphose. Les 9 familles de PJ-08-R3 n'ont pas survécu. Une autre ponte a été entreprise en 2009 mais les larves n'ont pas atteint le stade de métamorphose.

Tab. 15: Origine et croisement de géniteurs des pontes de l'année 2008. Nomenclature des lots produits : Initiales majuscules du nom vulgarisé de l'espèce de la palourde (exemple : PJ pour palourde japonaise), deux derniers chiffres de l'année de la ponte, lettre R pour « résistant » et numéro de la ponte.

	Date de ponte		
	14/05/2008	27/05/2008	26/09/2008
Origine et croisement des géniteurs	PJ-06-10 (1 mâle et 2 femelles), PJ-06-07 (1 mâle)	PJ-06-10 (mâle testé résistant et 2 femelles)	PJ-06-10 3x (1 mâle et 3 femelles)
Nombre de familles	4	3	9
Nom du lot	PJ-08-R1	PJ-08-R2	PJ-08-R3
Total	16 familles		

Les pontes sont très difficiles à réaliser avec trop peu de géniteurs (<20). En général, il faut une soixantaine de géniteurs pour provoquer la ponte dans la table de ponte (cf. Fig. 12 du chapitre 2). Les géniteurs regroupés se stimulent les uns les autres. Le problème des faibles densités dans la table de ponte est l'inhibition de la stimulation d'éjection des gamètes. De plus, contrairement à l'huître creuse, les *strippings* (incision de la gonade) ne sont pas opérants sur les palourdes japonaises. De plus, le souhait de conserver les géniteurs vivants n'est pas compatible avec ces *strippings*.

### 1-3 Génotype des parents

Les génotypes des géniteurs des lots PJ-08-R1 et PJ-08-R2 des six loci choisis lors des premières sélections des géniteurs (cf. article 2 p. 125) ont été déterminés sur les parents des familles obtenues lors des croisements à Leucate, sauf le génotype de l'Asari 54 du mâle M2 (Tab. 16). Il semblerait, après plusieurs échecs sur l'obtention d'amplification, qu'un allèle nul existe pour ce locus Asari 54, ce qui n'avait pas été suspecté auparavant (Yasuda *et al.*, 2007).

Les génotypes des locus Asari 24 et Asari 54 sont très peu différents. De plus, la présence d'allèles nuls pour l'Asari 55 suggérés par Yasuda *et al.*, 2007 n'est pas favorable pour la détermination exacte des génotypes de la descendance. Ainsi, ces trois loci (Asari 24, Asari 54 et Asari 55) sont exclus de l'analyse pour la détermination de la parenté de nos familles.

Par contre, la diversité allélique des loci Asari 16, Asari 62 (pour les deux lots PJ-08-R1 et -R2) et Asari 64 (pour PJ-08-R2 uniquement) est plus favorable et l'ensemble des 3 loci permet de discriminer les familles. L'apparentement n'a été que rarement indéterminé.

Tab. 16: Génotypes des géniteurs des familles des lots de pontes PJ-08-R1 et PJ-08-R2 de 6 loci. Mâles : M1 à M3 et Femelles : F1 à F5. nd : non déterminé.

		<i>Asari 16</i>	<i>Asari 24</i>	<i>Asari 54</i>	<i>Asari 55</i>	<i>Asari 62</i>	<i>Asari 64</i>
Familles de la ponte PJ-08-R1	M1	163/169	167/167	247/247	193/196	228/232	114/122
	M2	163/165	167/177	nd	196/196	230/242	122/130
	F1	163/173	167/177	245/247	187/199	226/226	130/130
	F2	171/171	167/177	245/247	187/199	222/242	122/130
Familles de la ponte PJ-08-R2	M3	171/171	167/177	247/247	193/199	222/226	122/130
	F3	163/163	167/177	247/249	199/201	228/232	122/130
	F4	165/173	167/167	249/249	201/201	226/230	124/124
	F5	163/177	167/167	249/249	193/201	228/232	122/127

#### 1-4 Apparentement

Des analyses génétiques approfondies sur les microsatellites n'ont pas été effectuées puisque l'intérêt de cet outil dans notre étude est uniquement de retrouver la parenté des individus obtenus lors des pontes. En outre, le coût des analyses PCR et d'électrophorèse est élevé. Ainsi, par soucis d'économie, le nombre de microsatellites analysés ont été restreints à la détermination de la filiation.

La distribution allélique des trois microsatellites analysés (Asari 16, 62 et 64) ont permis de déterminer les familles. Tous les croisements possibles ont été

relevés sur le terrain. Néanmoins, les distributions des familles varient beaucoup. En effet, la famille M2F2 issue du mâle M2 et de la femelle F2 du lot PJ-08-R1 et la famille M3F4 issue du mâle M3 et de la femelle F4 du lot PJ-08-R2 sont majoritaires sur l'ensemble de l'étude (cf. publication Tableau 2 p.161).

Au cours des analyses microsatellites, une diminution de la fréquence de certains allèles sur les quelques microsatellites traités a été observée notamment sur les palourdes de la famille issue de la femelle F5. En effet, dans la famille M3F5, les allèles 177 et 127 des loci Asari 16 et 64 respectivement n'ont pas été souvent retrouvés. Cette famille est de plus peu représentée dans le lot PJ-08-R2. Ceci est probablement dû à la faible quantité de larves obtenues lors de la ponte. La femelle F5 aurait moins émis d'ovocytes. Par ailleurs, une sélection par utilisation de tamis en phases larvaires peut en être la cause. Une discrimination des larves les plus petites et à fixation plus lente a été prouvée sur les productions d'huîtres par Taris et ses collaborateurs (2006). Ces phénomènes sont liés à une perte de la diversité génétique (Taris *et al.*, 2006).

## 2- Détermination de la parenté par un caractère phénotypique de la coquille

Dès les premières déterminations des génotypes sur les juvéniles des familles, l'observation des coquilles a permis de rassembler des groupes d'ornementations par des dessins et des couleurs particuliers. Il s'est avéré que les animaux ayant la même ornementation appartiennent à la même famille préalablement déterminée par les génotypes des microsatellites.

Cette observation a été très utile pour différencier à l'œil nu les familles. Ceci a permis de diminuer le coût pour l'identification de la parenté au cours de la thèse.

Les familles analysées pendant toute la thèse ont été limitées aux familles issues des croisements de géniteurs : M2xF1, M2xF2, M3xF3, M3xF4 et M3xF5 en utilisant les groupes de patterns décrits dans la publication sous forme de « short communication » en révision pour *Aquaculture*.

Article 2 sous forme de « Short Communication » à Aquaculture en révision

Title: Shell color and shell pattern as a complementary tool of microsatellites for *Ruditapes philippinarum* family identification in field experiments.

Authors

Fanny Jeffroy, and Christine Paillard,

IUEM, UMR CNRS 6539, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin,  
Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

Corresponding author :

Fanny Jeffroy. fannyjeffroy@yahoo.fr

UMR CNRS 6539, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Technopôle  
Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

Phone : +33 (0)2 98 49 88 61 – Fax : +33 (0)2 98 46 86 45

**Summary**

In this study, allelic diversity and frequencies were obtained for six *Ruditapes philippinarum* microsatellite loci within two French populations. We produced families from those French population genitors. Parentage in families was recognized using microsatellite tool. A correlation between the parentage and the shell color and ornamentation was demonstrated. Pattern variety of shell could be used for family identification and genitor selection.

**Keywords**: Clam; Ornamentation; Shell; Microsatellite.



## 1. Introduction

Both outer valves of Veneridae species are composed of different ornamentations. The streaks produce different shapes and more or less concentric and/or radial orientations. The whole valve parameters are generally specific to each species. *Ruditapes philippinarum* possesses tight concentric and radial streaks. Another shell characteristic is the external valve color diversity between individuals within this specie. In this clam, the colorations are usually symmetric. Indeed, the pattern is similar on both valves (Peignon et al, 1995). The superficial *R. philippinarum* shell colors include yellow, orange, brown, purple, blue, green, white and black forming patterns and marks composed by polyene pigments (Trinkler et al, 2010). Several studies supplied the genetic control of the variation in shell color and patterns in mollusks (Newkirk et al, 1980; Winkler et al, 2001; Gantsevitch, 2005). Japanese clams are important aquacultured mollusks highly studied because of their diseases (Paillard et al, 1994, Dang et al, 2009, Park et al, 2008). Studies in common garden are undertaken to highlight processes during the Brown Ring Disease (BRD) development in Manila clams (Trinkler et al, 2010). The best tool to identify families in genetic population studies is genotype determination on several microsatellites sequences. For *R. philippinarum*, 22 microsatellites have been developed (Yasuda and al, 2007; An et al, 2009).

In this study, we first analyzed the microsatellites allelic diversity within two clam breedings coming from the SATMAR Company cultured in a French site. Then, families were produced with some genitors coming from those population breedings. Juveniles were seeded in natural environment for field surveys and experiments. Using microsatellite genotypes, we show here the correlation between the parentage

determination and the shell color pattern heritage in families of *R. philippinarum*. These results suggest that pattern variety could be very useful for experimental field studies.

## 2. Material and methods

The clams used in this genetic population study came from an aquaculture site: the Brouënnou in Landéda in North Finistere in Brittany. This site is famous because of the presence of the brown ring disease responsible for clam production decrease in Brittany since the end of the 80's (Paillard et al, 1994). In 2006, the SATMAR Company produced and seeded two clam breedings (named Stock 1 and Stock 2) in Landéda. Then, families were produced by genitors coming from the Stock 1 or Stock 2 in the SATMAR hatchery in 2008 and seeded in fields during the same year in a BRD-free site (Île Tudy in South Finistere).

For genotypes determination, six microsatellites PCR were conducted. Hundred microliters of hemolymph were collected by insertion of a sterile needle syringe through the hinge and into the posterior adductor muscle. DNA extraction was carried out by the DNeasy Tissue Kit (Qiagen). The PCR amplification was performed on a Applied Biosystems GeneAmp PCR system 9700 thermal cycler in a 10 $\mu$ l reaction volume containing 0.5 $\mu$ l DNA; 1X PCR buffer, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, Taq polymerase 0.5U (Promega); 0.5 $\mu$ M TAMRA labelled forward primer and 0.5 $\mu$ M reverse primer. Thermal cycling conditions were : 1 cycle of activation of Hot start Taq polymerase at 95°C for 3 min; 38 cycles of amplification at 95°C for 30s, 55°C for 30s and 72°C for 30s followed with a final cycle at 72°C for 5min. Fragment size

was determined by electrophoresis on an Applied Biosystems 3130 sequencer. Genotypes were identified using the GeneMapper ® Software.

Genitors came from Stock 1 and Stock 2. Statistical allelic analyses of microsatellites were performed with the Genetix software (4.5) (Belkhir et al, 2004).

### 3. Results and discussion

All loci from populations coming from hatchery are polymorphic (Tab.1). Both stock populations examined showed high levels of expected heterozygosity ( $H_e$ ) varying from 0.549 to 0.833. For the 6 microsatellites loci analyzed, observed heterozygosities ( $H_o$ ) varied from 0.456 to 0.913. The number of alleles per locus was high and ranged from 7 to 12. Four loci showed more alleles in the stock 1 than in the stock 2 while the two other loci have less alleles in Stock 1 than in stock 2. Moreover, for Asari55, Asari62 and Asari64, some alleles were in Stock 1 and not in Stock 2 and *vice versa*. Significant heterozygote deficiencies were found in two loci (Asari54 in Stock 1 and Asari55 in both stocks). A heterozygote excess was observed in Asari24 and only in stock1. Fis followed the same tendency in both sites.

Due to high microsatellite polymorphism, genitors with heterozygous genotypes have been preferentially chosen during the crossings. Then, families have been mixed and have grown together in common garden conditions. Thus, the expectation of offspring genotypes for several loci had been possible for parenthood identification in field experiments.

Offspring on both populations produced four half sibs in the first breeding (two males M1 and M2 with two females F1 and F2) and three half sibs in the second breeding (one male M3 three females F3, F4 and F5). Microsatellites were used to identify parenthood in offsprings as it is usually performed in genetic population. Moreover,

clams in these populations had pattern that appeared quasi identical forming pattern groups (Tab.2). We obtained clearly and easily eye recognizable patterns : 5 patterns (named P1 to P5) and 6 patterns (named P6 to P11) respectively for the first and the second offspring population. These patterns corresponded to cross-breeding families determined with microsatellites analyses. Only one pattern P2 did not allow to identify the family by eye because it was formed by a mix of two families M1F2 and M2F2 (Tab.1). However, the female F2 is representative of this pattern. Interestingly, families M1F1, M2F1 and M3F5 were represented in only one pattern each (P3, P5 and P11 respectively) whereas the other families were represented in two or three patterns. Moreover, some heritable patterns and color backgrounds were observed in offspring. More frequently those particularities come from the mother shell. Indeed, white lines, dark triangles and point are details observed in offspring coming from three mother's pattern.

The polymorphism in all loci analyzed in *R. philippinarum* aquaculture stocks production shows richness in allele diversity. Heterozygosity deficiency observed in the locus Asari54 is in accordance with the results obtained in Yasuda et al, 2007 and it is probably due to presence of null allele. This genetic diversity of genitors is favorable for experimental family production and field surveys. The control on broodstock in field can be operated if the family genotypes are known after crossing using the microsatellite tool.

In our crossing families, we have obtained an inheritance of black triangles, white lines and point shapes near the hinge resulting from the female-genitor pattern. Moreover, all patterns of these families have been also found in other seeding sites presenting contrasted environment. Thus, the diversity in Manila clam shell color does not seem due to the environment. Reports have shown that shell pigmentation is under

low selective pressure when the phenotype has a high variability (Evans et al, 2009). The shell of *R. philippinarum* holds a huge variability in color panel and pattern types. In Manila clam, the ornamentation variety seems to be controlled by one multiallelic gene (Peignon et al, 1995). That is encouraging for diversity preservation.

The use of color and pattern shell families could be interesting in experiments in aquaculture stocks. The pattern observation can be quickly performed at the seeding age (around 10mm). Eye recognition of families of Manila clam *R. philippinarum* by the pattern and shell color is a considerable gain of time and money by diminishing the genotypes analyses.

#### **Acknowledgements:**

The study was supported by the Region Bretagne. Authors thank the SATMAR Company for providing clams. Thanks to P. Boudry for pertinent discussion concerning the crossings between genitors.

#### **References**

An, H., Kim, E., Park, J., 2009. Isolation and characterization of microsatellite markers for the clam *Ruditapes philippinarum* and cross-species amplification with the clam *Ruditapes variegata*. *Conservation Genetics* 10, 1821-1823.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. 1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Dang, C., Gonzalez, P., Mesmer-Dudons, N., Bonami, J.R., Cailly-Milly, N., De Montaudouin, X., 2009. Virus-like particles associated with brown muscle disease in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Arcachon Bay (France). *Journal of Fish Diseases* 32, 577-584.

Evans, S. Camara, M.D., Langdon, C.J., 2009. Heritability of shell pigmentation in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 286, 2116216.

Gantsevich M. M., TyunnikovaA. V., Malakhov V. V., 2005. The Genetics of Shell Pigmentation of the Mediterranean Mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Bivalvia, Mytilida). *Doklady Biological Sciences* 404, 370-371.

Gary F, N., 1980. Genetics of shell color in *Mytilus edulis* and the association of growth rate with shell color. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 47, 89-94.

Paillard, C., Maes, P., Oubella, R., 1994. Brown ring disease in clams. *Annual Review of Fish Diseases* 4, 219-240.

Park, K.-I., Tsutsumi, H., Hong, J.-S., Choi, K.-S., 2008. Pathology survey of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* occurring on sandy tidal flats along the coast of Ariake Bay, Kyushu, Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* 99, 212-219.

Peignon, J.-M., Gérard, A., Naciri, Y., Ledu, C., Phélipot, P., 1995. Analyse du déterminisme de la coloration et de l'ornementation chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*. *Aquatic Living Resources* 8, 181-189.

Trinkler, N., Sinquin, G., Querne, J., Paillard, C., 2010. Resistance to Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: A study of selected stocks showing a recovery process by shell repair. *Journal of Invertebrate Pathology* 104, 8-16.

Trinkler N., Bardeau JF., Marin F., Labonne M., Jolivet A., Crassous P., Paillard C., 2011. Mineral phase in shell repair of Manila clam *Venerupis philippinarum* affected by brown ring disease. *Diseases of Aquatic Organisms* 93, 149-162.

Winkler, F.M., Estevez, B.F., Jollan, L.B., Garrido J.P., 2001. Inheritance of the General Shell Color in the Scallop *Argopecten purpuratus* (Bivalvia: Pectinidae). *Journal of Heredity* 92, 521-525.

Yasuda, N., Nagai, S., Yamaguchi, S., Lian, C.L., Hamaguchi, M., 2007. Development of microsatellite markers for the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Molecular Ecology Notes* 7, 43-45.

Table1 :

Locus		Stock 1	Stock 2	total
		N=105	N=65	
Asari16	A	7	6	7
	He	0,733	0,717	
	Ho	0,780	0,760	
	Fis	-0,064	-0,061	
	p	0,855	0,2544	
Asari24	A	7	5	7
	He	0,646	0,593	
	Ho	0,666	0,795	
	Fis	-0,031	-0,346	
	p	0,001 *	1,000	
Asari54	A	9	5	9
	He	0,712	0,549	
	Ho	0,562	0,456	
	Fis	0,212	0,17	
	p	0,031 *	0,060	
Asari55	A	9	10	12
	He	0,815	0,833	
	Ho	0,461	0,739	
	Fis	0,435	0,115	
	p	0,000 *	0,0225 *	
Asari62	A	9	8	11
	He	0,789	0,742	
	Ho	0,850	0,854	
	Fis	-0,078	-0,153	
	p	0,968	0,978	
Asari64	A	6	7	8
	He	0,708	0,783	
	Ho	0,807	0,913	
	Fis	-0,14	-0,235	
	p	0,996	0,909	
All loci	He	0,734	0,696	54
	Ho	0,688	0,753	



Table 2 :



First cross-breeding | Second cross-breeding

Name of pattern group	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
Parenthood	M2F2	M1F2 and M2F2	M2F1	M1F2	M1F1	M3F3	M3F3	M3F4	M3F4	M3F4	M3F5
Frequency in the crossing population (%)	43.7 +/-11.4	32.6 +/-9.2	20.7 +/-9.1	2.5 +/-3.2	<1%	17.3 +/-4.1	14.9 +/-4.4	25.2 +/-5.3	9.1 +/-4.3	19.7 +/-7.8	13.8 +/-5.2
Shell background color	Blue green	White yellow	Yellow	Yellow green	Blue green	Dark blue	White blue	Light blue	Yellow	Yellow	Yellow
Pattern	Two white lines	Yellow green black streaks	Two black triangles	Two wide brown triangles	Two wide black triangles	Few dark streaks	Few dark streaks	One point near the hinge	One point near the hinge	Many hazardous streaks	Light brown streaks

Figure captions:

Table 1: Main genetic variability measures for two *Ruditapes philippinarum* stocks. N: sample size; He: unbiased expected heterozygosity according to Hardy-Weinberg; Ho: observed heterozygosity; A: number of alleles per locus; Fis : inbreeding coefficient at each locus. \* means significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium at  $p < 0.05$ .

Table 2: Photos, frequencies and characteristics of shell color and pattern groups in produced families of *Ruditapes philippinarum*.



**Chapitre 6 :**  
**Comparaison des performances physiologiques**  
**des familles en « common gardens »**  
**et au laboratoire**



## Introduction

L'étude de populations soumises à un environnement particulier (« common garden ») permet de déterminer des facteurs génétiques liés à des caractères phénotypiques (Bower et Stamp, 1993, Han *et al.*, 1994). La plupart des études entreprises sur les organismes d'importance économique sont basées sur la maîtrise de la croissance et des formes de résistance des plantes et des animaux afin d'améliorer leur production (Ordas *et al.*, 2008, Huvet *et al.*, 2008). D'autres études ont permis de relier la génétique des organismes à des résistances face à des prédateurs, des agents pathogènes ou des stress abiotiques (Lawlor *et al.*, 2009; Vandeputte et Prunet, 2002 ; Osier et Lindroth, 2006). Les études menées sur les mollusques marins traitent surtout de la génétique des populations (Quillet *et al.*, 2007). Néanmoins, peu d'études ont été menées sur des familles, dont la principale en France concerne les familles d'huîtres *C. gigas* produites au cours du projet MOREST. Elles ont permis de montrer des différences de croissance entre plusieurs sites de culture mais également des QTLs liés à la résistance (Samain et Mc Combie, 2007 ; Dégremont *et al.*, 2010). L'étude en « common garden » permet de discriminer les capacités physiologiques entre les familles placées dans le même environnement. Les animaux d'une même famille sont génétiquement très proches et peuvent être représentatifs de caractères phénotypiques induits par un stress tels que la présence d'un agent pathogène. Williams et ses collaborateurs (2008) ont démontré qu'il est préférable de suivre les réponses environnementales sur plusieurs sites pour détecter des bases génétiques de traits différents. Notre étude s'intéresse aux capacités de résistance des familles face à la MAB. Un suivi des familles sur trois sites a donc été entrepris pendant 18 mois pour évaluer la croissance des animaux, les proportions des familles et les prévalences de la MAB.

Les premières expérimentations ont été menées sur des larves de plusieurs familles par des biotests de contamination avec l'agent pathogène.

Des tests en laboratoire ont également permis de comparer des juvéniles et des adultes des familles de première génération des trois sites pour estimer leur état de santé en mesurant, à partir de l'hémolymphe : la concentration et la viabilité des hémocytes, la capacité d'adhérence, la concentration de NO et

l'expression de gènes liés au stress bactérien. Les familles ont été volontairement exposées au *V. tapetis* pour observer leurs comportements dans le but d'identifier une ou plusieurs familles montrant de meilleures capacités de défense. Les résultats de cette étude ont permis de discriminer, par rapport aux autres familles, une famille présentant des capacités de défense plus efficaces et une autre montrant des capacités de défense faibles.

## 1- Tests préliminaires sur les larves de palourdes : effet de *V. tapetis*

Pour les deux lots de pontes, les larves issues de chaque croisement ont été mélangées dès le stade D. Ainsi, les larves n'ont pas pu être testées pour chaque famille.

Les larves pédivéligères du lot PJ-08-R1 (100µm à 150µm) ont été mises en contact avec *V. tapetis* dans des microplaques 6 puits. Ces larves en cours de fixation avant la métamorphose pouvaient donc sédimenter dans leur milieu de culture. 20 larves par puits (en triplicat) ont été plongées dans 1 ml de solution bactérienne à différentes concentrations ( $4 \cdot 10^2$ ,  $4 \cdot 10^4$  et  $4 \cdot 10^6$  bactéries.ml<sup>-1</sup>). Des larves contrôles baignaient dans 1 ml d'eau de mer stérile.

Une augmentation du nombre de larves dégradées (Fig. 26) est observée dès 24 heures d'incubation avec le *V. tapetis* jusqu'à 72 heures (Fig. 27). De plus, au bout de 72 heures les larves commencent à s'affaiblir naturellement puisque le pourcentage de larves dégradées en EMSF atteint 7%. Cependant, seule la concentration la plus élevée de *V. tapetis* ( $4 \cdot 10^6$  b.ml<sup>-1</sup>) entraîne une plus forte augmentation du nombre de larves dégradées.

Des études précédentes effectuées lors d'un stage de DESS ont donné des résultats similaires. Une concentration de *V. tapetis* à  $10^4$  bactéries.ml<sup>-1</sup> n'entraînaient pas une forte mortalité des larves alors qu'une concentration de bactéries à  $10^6$  bactéries.ml<sup>-1</sup> provoquait des mortalités de l'ordre de plus de 40% après 3 jours (Ker, 1998).



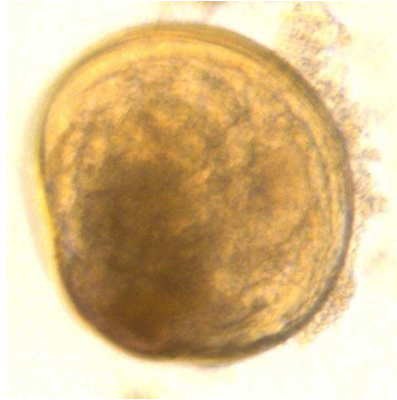


Fig. 26 : Photo d'une palourde dégradée présentant une détérioration des tissus. Les organes (branchies, pied) d'une larve active en bonne santé sont visibles par transparence à travers la coquille.

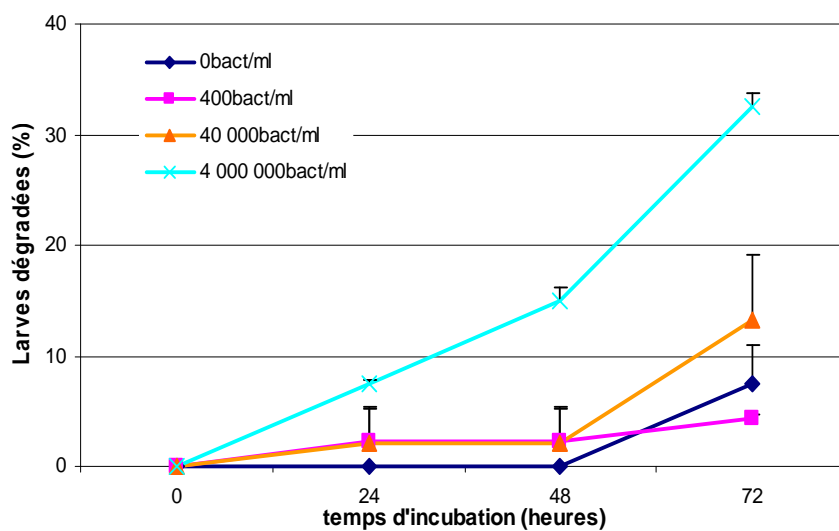


Fig. 27: Larves dégradées (%) par différentes concentrations de *V. tapetis* à 24, 48 et 72 heures d'incubation par baignation.

Ces résultats ont permis d'estimer l'effet de la bactérie sur les larves. Cependant, nous n'avons pas pu comparer les comportements pour chaque famille du fait du mélange réalisé à l'écloserie. De plus, la détermination de la parenté sur les larves n'était pas réalisable à cause du nombre trop petit de larves dans cette expérience.

## 2- Suivi en « *Common gardens* »

Dans chacun des sites, pour chaque famille, un suivi de sa proportion au sein du lot, de la taille de ses coquilles, et de la prévalence de la MAB a été entrepris à partir de la date des semis jusqu'à juillet 2010. Les suivis ont été analysés pour chaque date d'échantillonnage sur 150 individus de chacun des deux lots PJ08 R1 et R2.

### 2-1 Températures des sites

Les températures des sites varient avec des températures maximales en été et des températures minimales en hiver (Fig. 28). Dans l'étang de l'île Tudy, les températures sont tout au long de l'année 2009 plus élevées que celles de Landéda et de Carantec en Baie de Morlaix.

En été, les températures de la Baie de Morlaix sont plus élevées que celles de Landéda mais sont très proches dans les mois les plus froids.

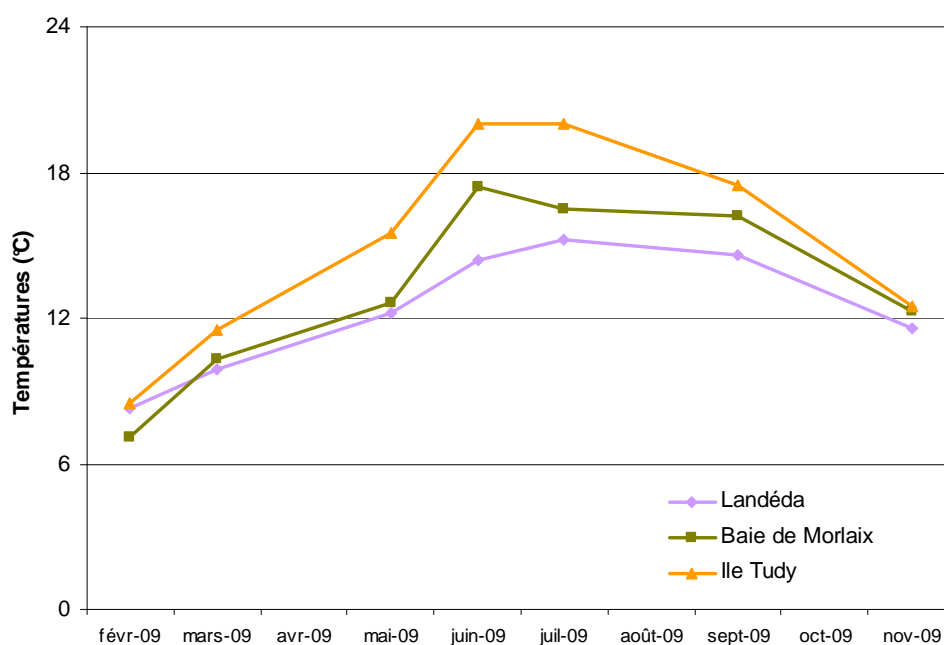


Fig. 28: Températures dans les sites étudiés sur l'année 2009.

## 2-2 Proportions des familles dans les deux lots PJ-08-R1 et PJ-08-R2

La proportion des familles pour chaque lot change tout au long du suivi dans les trois sites (Fig. 29). Cependant quels que soient les sites, les familles M2F2 du lot PJ-08-R1 et M3F3 du lot PJ-08-R2 sont les plus représentées et sont rarement inférieures à 40%. La famille M3F5 est la moins représentée.

M2F2 représente une très grande partie de la population avec une proportion rarement inférieure à 40%. La proportion de la famille M2F1 varie entre 16% et 35% pour le site de Landéda et reste assez constante pour les deux autres sites autour de 20% pour Carantec et 10% pour l'île Tudy.

Les autres familles du lot PJ-08-R1 (M1F1 et M1F2) ne sont pas représentées. En effet, soit elles n'étaient pas identifiables soit elles n'étaient pas récoltées au cours de l'échantillonnage.

Clairement, nous n'avons pas observé de disparition de familles au cours du suivi d'avril 2009 à Juillet 2010. Néanmoins, lors de l'échantillonnage d'avril 2010 aucune palourde de la famille M3F5 de Carantec n'a été récoltée. Ceci ne correspondait pas à la disparition de la famille puisqu'elle représentait plus de 15% des palourdes du lot PJ-08-R2 trois mois plus tard, en Juillet 2010. Mais l'absence de la famille M3F5 lors de l'échantillonnage peut être dûe au faible effectif constamment mesuré dans les trois sites depuis le début du suivi. Un échantillonnage plus grand (>350 palourdes) aurait peut être permis de récolter quelques individus de cette famille M3F5 en avril 2010.

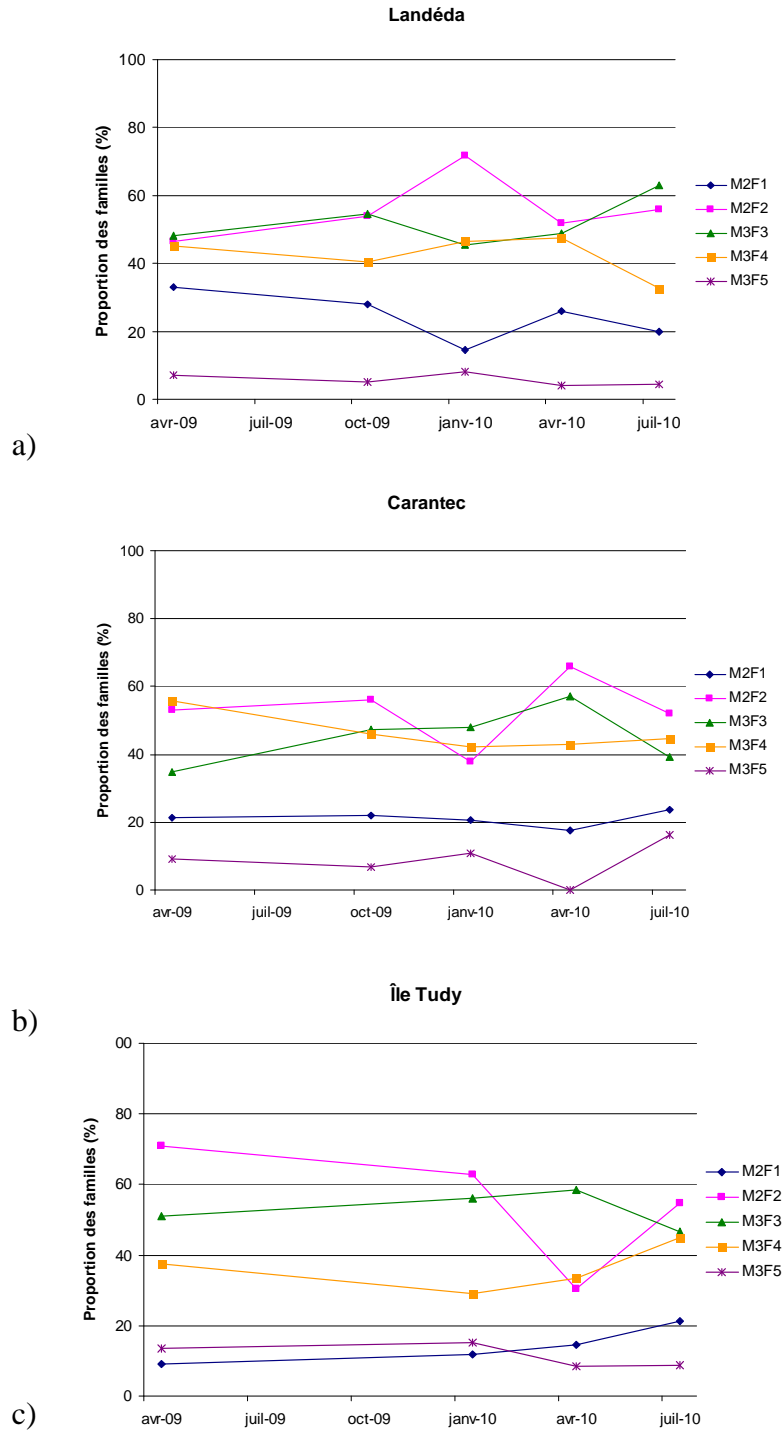


Fig. 29 : Proportion des familles (%) des lots PJ-08-R1 (familles M2F1 et M2F2) et PJ-08-R2 (familles M3F3, M3F4 et M3F5) d'avril 2009 à juillet 2010 sur les trois sites : Landéda a), Carantec b) et Ile Tudy c).

## 2-3 Croissance

La taille des individus du lot de familles PJ08R1 au moment des semis était significativement inférieure de celle des familles du lot PJ08R2 (14.71mm +/- 0.02 et 15.54 mm +/- 0.02 respectivement) (Fig. 30).

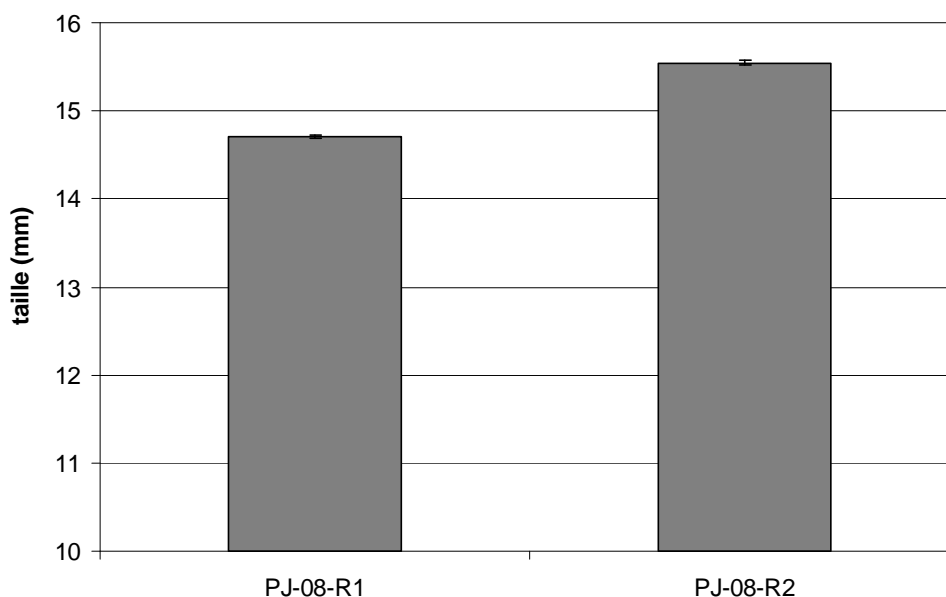


Fig. 30: Taille moyenne des lots PJ08 R1 et R2 au moment des semis.

La croissance la plus rapide est observée à l'Île Tudy suivi de Carantec et enfin Landéda (Fig. 31). La différence de taille entre les deux lots à tendance à croître pour le site de Landéda alors qu'il diminue sur l'Île Tudy. Ceci peut être dû aux conditions environnementales biotiques comme l'apport nutritif ou abiotiques comme les variations de la température. En effet, Landéda et Carantec sont situés au Nord du Finistère où les températures de l'eau sont un peu plus faibles qu'à l'Île Tudy dans le Sud Finistère. De plus, l'apport nutritif est plus riche dans l'étang fermé de l'Île Tudy que sur les deux autres sites de culture car l'hydrodynamisme y est beaucoup plus faible. D'autre part, les sites de Landéda et de Carantec sont des sites où la MAB est recensée. Les individus touchés par la maladie pourraient ralentir leur croissance due à une baisse de l'énergie comme Flye-Sainte-Marie et ses collaborateurs l'ont démontré en 2007.

Pour les trois sites, la croissance des familles du lot PJ08R1 a été plus importante permettant aux familles de ce lot de dépasser, dès le printemps suivant le semis, la taille des individus du lot PJ08R2. Par la suite, les palourdes du lot PJ-08-R1 sont toujours significativement supérieures à celles du lot PJ-08-R2.

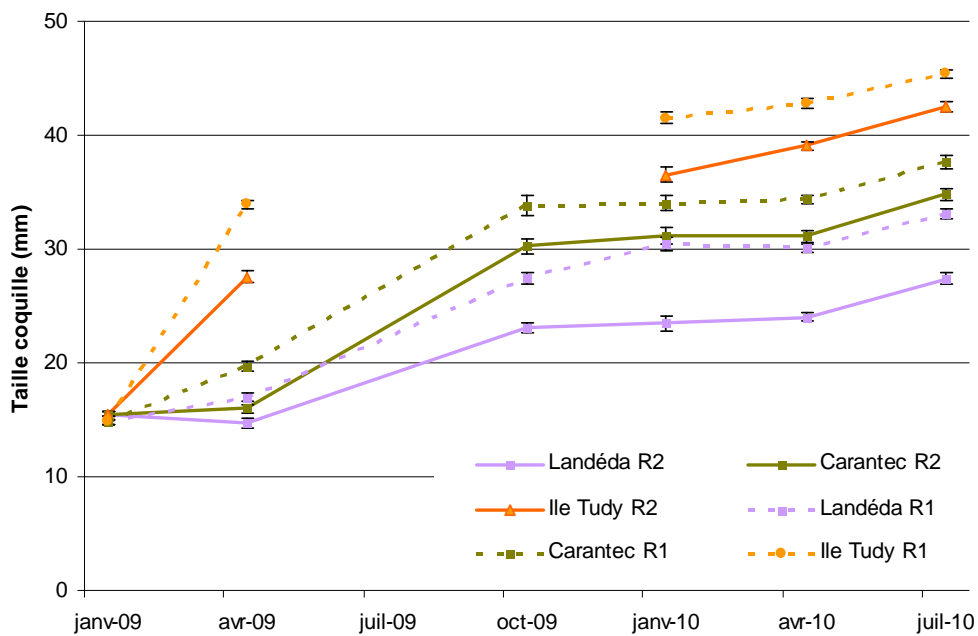


Fig. 31: Evolution de la taille moyenne (mm) des coquilles de palourdes des trois sites (Landéda, Carantec et Ile Tudy) par lot de pontes (PJ08-R1 et PJ08-R2) des semis à Juillet 2010.

Par contre, les tailles de coquille des palourdes ne présentent pas de différences significatives entre les familles au sein d'un même lot (Fig. 32).

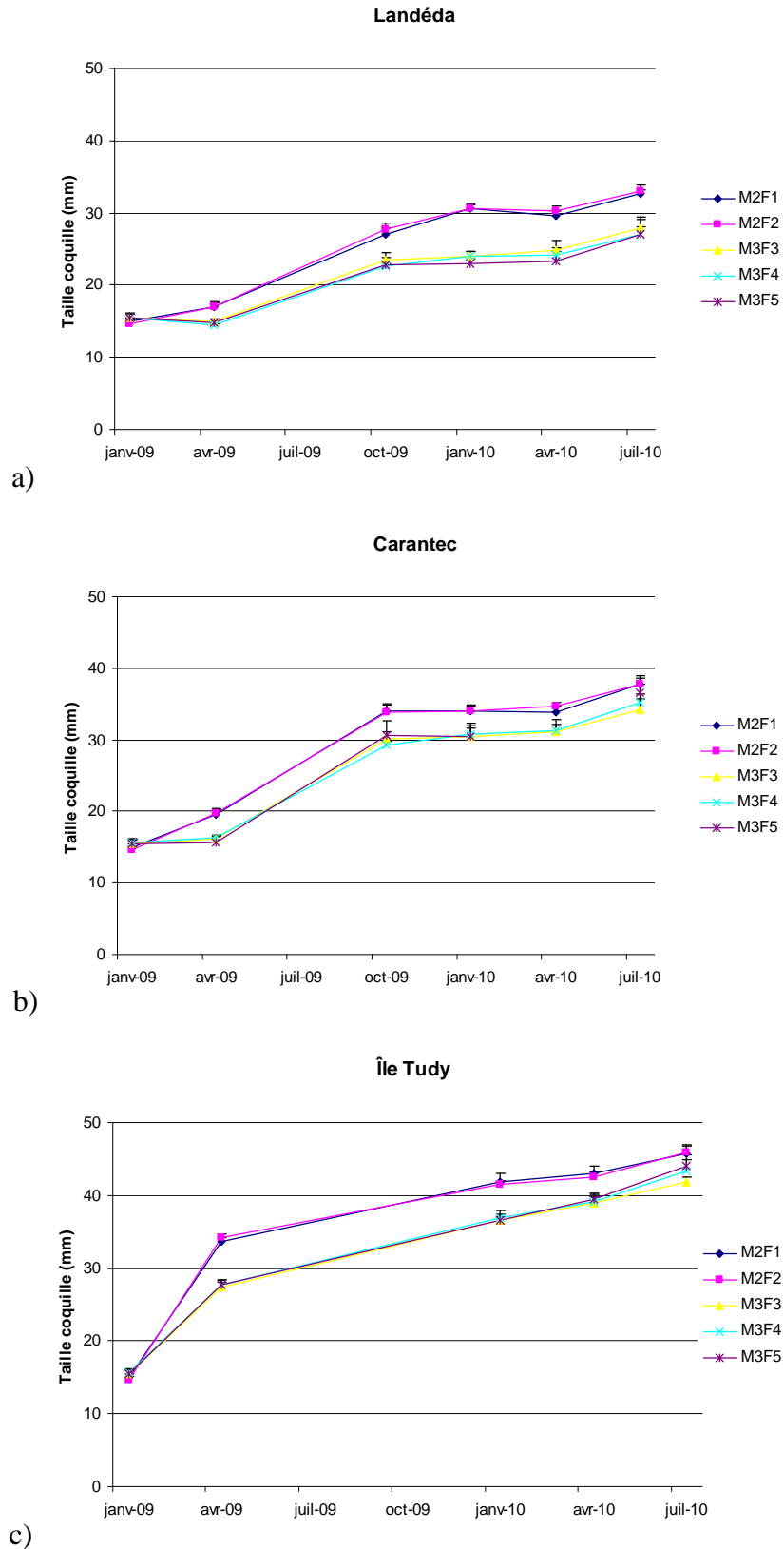


Fig. 32 : Evolution de la taille de la coquille (mm) par famille de Janvier 2009 à Juillet 2010 sur les trois sites : Landéda a), Carantec b) et Ile Tudy c).

## 2-4 Prévalence de la MAB

Au printemps 2009, quatre mois après le semis, seul le site de Carantec présente la MAB (Fig. 33). La prévalence de la MAB affecte toutes les familles (5 à 40%) (Fig. 33b). Les symptômes de la maladie apparaissent plus tardivement (à l'automne suivant le semis) sur le site de Landéda et ne sont observables qu'après un an et demi après le semis sur le site de l'Île Tudy (avril 2010) (Fig. 33b et c). Un effet cyclique est noté pour le site de Carantec puisque la prévalence retombe à l'automne 2009 et en été 2010 après des valeurs assez élevées en avril 2010. Une prévalence plus faible est également notée à l'Île Tudy en été 2010. Par contre, sur Landéda, deux familles (M2F1 et M2F2) conservent une prévalence élevée de la MAB. Ces deux familles sont celles ayant les tailles les plus grandes. En 2009, Flye Sainte-Marie et collaborateurs ont montré une corrélation positive entre les stades de maladie et l'âge des animaux. La croissance des palourdes est  $X$  ce qui suggère que cette corrélation serait corrélée à l'âge de palourdes. Ceci est vérifié sur le site de Landéda mais ne l'est pas sur Carantec et l'Île Tudy. Les stades de MAB des trois sites pour avril 2010 sont illustrés par la figure 34.

Sur le site de l'Île Tudy, la prévalence est assez forte mais il s'avère que très peu d'individus atteignaient des CDS supérieurs ou égaux à 4. **L'Île Tudy présente un décalage dans le temps au niveau de l'apparition et du développement de la maladie.**

Les symptômes de la maladie sur les individus de l'Île Tudy apparaissent lorsque les individus ont dépassé la taille commerciale qui a été réduite de 40mm à 35mm en 2008. En effet, la taille des individus atteignaient respectivement 37mm et 42mm pour les deux lots PJ-08-R1 et PJ-08-R2. Ces individus, s'ils avaient été commercialisés, auraient déjà été récoltés quelques mois avant l'échantillonnage d'avril 2010 et la maladie n'aurait alors pas forcément été diagnostiquée. Les fortes mortalités dans les années 80 sur le site de Landéda étaient observées durant l'hiver lorsque les températures de l'eau et du sédiment sont froides. Dans notre étude, nous n'avons pas recensé les mortalités sur le terrain mais nous observons que les prévalences les plus fortes se situent après l'hiver.



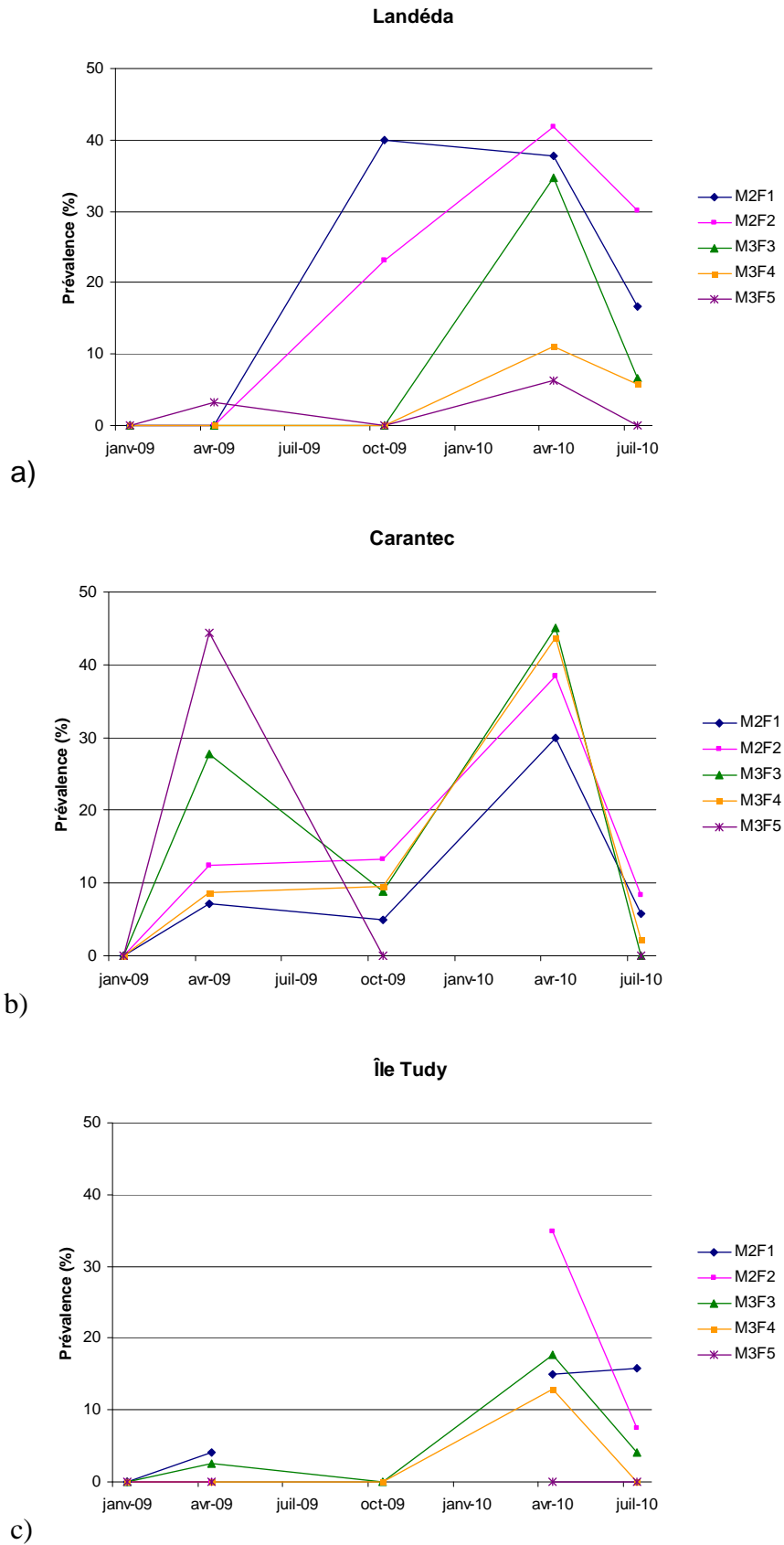


Fig. 33: Evolution de la prévalence de la MAB dans les familles de Janvier 2009 à Juillet 2010 sur les trois sites : Landéda a), Carantec b) et Ile Tudy c).

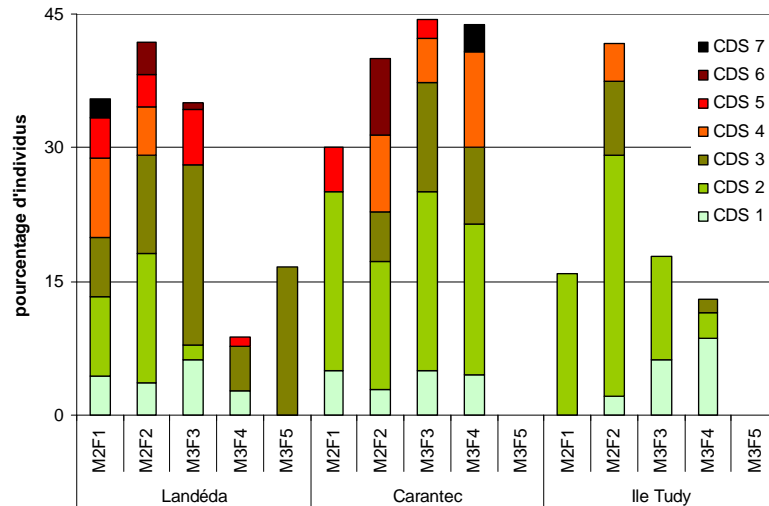


Fig. 34 : Pourcentage des individus par stade de maladie (CDS 1 à 7) sur les familles des trois sites en avril 2010.

En conclusion, la croissance des familles de palourdes diffèrent selon les sites de culture. Les familles M2F1 et M2F2 sont de tailles supérieures aux autres familles pour les trois sites et l'Ile Tudy présente des palourdes de taille supérieure aux autres sites pour l'ensemble des familles. De plus, la prévalence et les stades de la MAB de l'Ile Tudy est moins importante que celles de Landéda et de Carantec.

**Dans notre condition d'étude, l'Ile Tudy semble plus propice à la culture de la palourde que les deux autres sites. Dans les trois sites, les familles M2F1 et M2F2 sont de tailles supérieures aux autres familles mais toutes les familles sont atteintes par la MAB avec des prévalences variables suivant les échantillonnages.**

### 3- Paramètres hématocytaires sur des juvéniles de l'Ile Tudy en Juin 2009.

Les individus des lots PJ08-R1 et R2 mesuraient 27.5mm +/-0.6 et 34.5mm +/-0.8 respectivement.

Les animaux ont été regroupés par famille en pool de 10 individus selon l'ornementation de la coquille mais l'apparementement a également été vérifié par l'analyse microsatellite sur 5 individus de chaque pool. Les familles analysées sont M2F1, M2F2, M3F3, M3F4 et M3F5. Aucune prévalence n'a été observée sur les palourdes de cette expérimentation.

Les mesures de paramètres hématocytaires tels que la concentration totale en hématocytes, la viabilité des hématocytes, l'adhérence, la concentration en NO et l'activité PO ont été réalisées.

### 3-1 Concentration et viabilité hématocytaire

La concentration cellulaire de l'hématolymph est relativement homogène entre les familles sauf pour la famille M3F3 dont l'hématolymph est plus de trois fois plus concentrée en hématocytes (Fig. 35). La viabilité des hématocytes varie entre les familles se situant entre 77% et 90% (Familles M3F5 et M3F3 respectivement) (Fig. 35).

F3

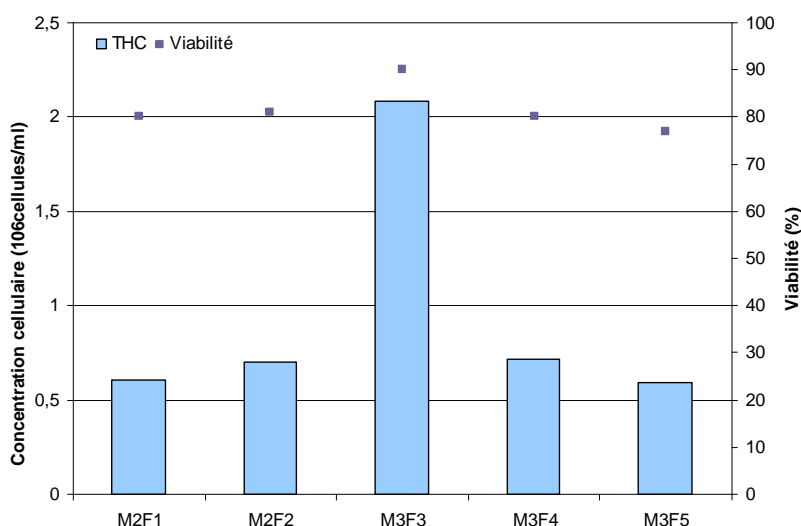


Fig. 35 : Concentration cellulaire (THC) en 10<sup>6</sup>cellules.ml<sup>-1</sup> et Viabilité (%) des hématocytes dans l'hématolymph pour chaque famille de palourdes (n=10 individus).

### 3-2 Capacité d'adhérence

Pour toutes les familles, le contact du *V. tapetis* a augmenté le pourcentage de cellules non adhérentes (CNA) ( $p < 0.0000$ ) (Fig. 36). Des différences significatives sont observées entre les familles pour la condition de base en EMSF ( $p < 0.001$ ) et en contact avec le *V. tapetis* ( $p = 0.041$ ). Les familles M2F1 et M2F2 montrent des pourcentages en CNA en condition EMSF inférieurs aux trois autres familles présentées. Cependant, les valeurs de CNA pour toutes les familles sont basses et font signe d'un bon état de base. En outre, les pourcentages de CNA après le contact avec *V. tapetis* sont plus

élevés pour les familles M3F4, M3F5 et M2F2 que pour les familles M3F3 et M2F1.

Une différence est également obtenue entre les familles pour le ratio ( $p < 0.0000$ ). La famille M2F2 montre le ratio le plus fort atteignant la valeur de 14. La famille M3F3 présente le ratio le plus faible de 1.9.

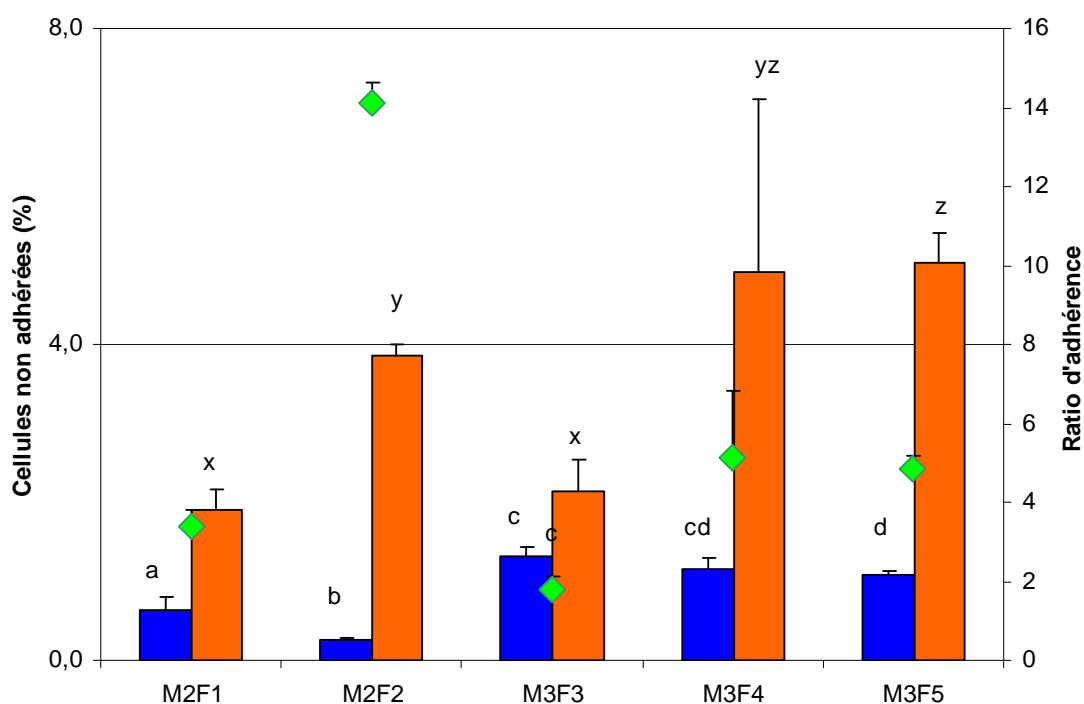


Fig. 36: Cellules non adhérentes (%) en condition EMSF (barres bleues) et après 3 h de contact avec *V. tapetis* (Vt) (barres oranges) et ratio d'adhérence (losanges verts) des différentes familles de palourdes. Les lettres indiquent les différences entre les familles (n=10 individus)

### 3-3 Concentration en NO

Pour toutes les familles, la concentration de NO augmente après le contact de 3h avec *V. tapetis* par rapport à la condition EMSF ( $p < 0.0001$ ) mais reste faible avec un maximum de NO à  $3.5\mu\text{M}$  pour la famille M3F4 (Fig. 37). La famille M3F4 présente la plus forte concentration de NO à l'état basal ( $2.7\mu\text{M}$ ). La famille M2F2 est celle qui montre la production la plus élevée ( $1.5\mu\text{M}$ ).

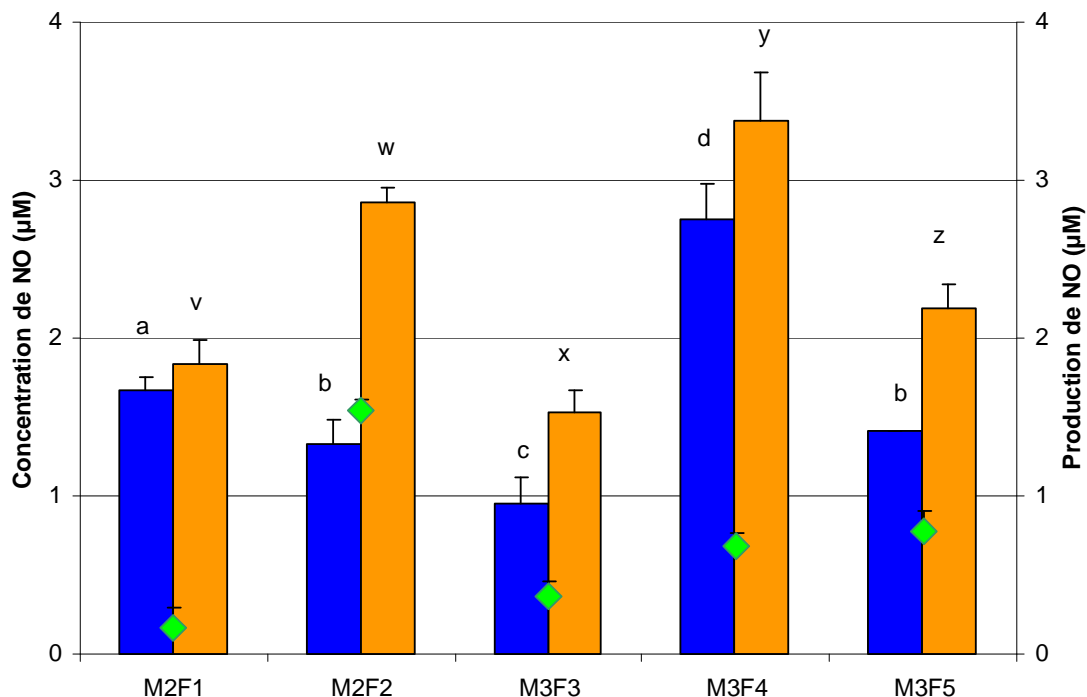


Fig. 37: Concentration en oxyde nitrique (NO) en µM par famille de palourdes en condition basale EMSF (barres bleues) et après 3 heures de contact avec le *V. tapetis* (Vt) (barres oranges) et production de NO (losanges verts).

Globalement, les faibles pourcentages de CNA et les faibles concentrations de NO en EMSF pour toutes les familles de l'île Tudy en juin 2009 montrent un bon état de santé général.

Nous pouvons noter que les prévalences à cette date sont également très faibles puisque la MAB était quasiment absente avant avril 2010 à l'île Tudy (cf. Fig. 33c p.151). Les familles peuvent alors être discriminées par leur comportement lors d'un contact avec *V. tapetis*. La famille M2F2 présente les valeurs les plus fortes pour le ratio d'adhérence et la production de NO. Ce fort ratio d'adhérence pourrait être représentatif d'une déficience des hémocytes par rapport aux autres familles. La famille M3F3, quant à elle, présente le ratio d'adhérence le plus faible ainsi qu'une THC et une viabilité élevées; elle montre des capacités hémocytaires supérieures aux autres familles.

4- Comparaison de l'état de santé des familles des trois sites suite à l'inoculation du *V. tapetis*.

Après une récolte des palourdes en décembre 2009 sur les trois sites de cultures, au moins 100 palourdes par site de chacun des deux lots PJ-08-R1 et PJ-08-R2 ont été inoculées et autant ont été placées en EMSF comme témoins.

L'incubation a duré 5 semaines.

#### 4-1 Concentration et viabilité hémocytaire

La figure 66 indique les concentrations hémocytaires obtenues après les cinq semaines d'incubation des palourdes en EMSF ou avec *V. tapetis*. La concentration hémocytaire de l'hémolymphe des 5 familles de Carantec inoculées est significativement inférieure à celle des témoins ( $p=0.013$ ) et est extrêmement faible pour les familles M2F1 et M3F3. Par contre, seules deux familles de l'île Tudy (M2F2 et M3F3) montrent une diminution significative de la concentration hémocytaire entre les deux conditions. L'absence de données dues aux mortalités sur quelques familles de Landéda ne permet pas l'analyse statistique. Cependant, la concentration hémocytaire des individus inoculés de Landéda par la bactérie est légèrement inférieure à celle des témoins.

Globalement, les concentrations hémocytaires baissent pour les trois sites après l'inoculation.

Les valeurs de viabilité montrent les mêmes tendances que celle de la concentration hémocytaire (Fig. 67). Hormis les animaux de Landéda, la viabilité des hémocytes est meilleure pour les animaux témoins que celle des animaux inoculés par la bactérie.

En outre, lorsque les données de Landéda sont exclues, une corrélation positive entre la viabilité et la THC est observée pour les deux conditions témoins et inoculés ( $r^2=0.69$ ,  $p=0.028$  et  $r^2=0.75$ ,  $p=0.012$  respectivement). En effet, plus la concentration en hémocytes est élevée plus la viabilité est haute. Allam et ses collaborateurs (2000) ont démontré une diminution de la concentration hémocytaire et une augmentation du pourcentage de cellules

mortes à partir du 14<sup>ème</sup> jour d'incubation sur des animaux inoculés par *V. tapetis*.

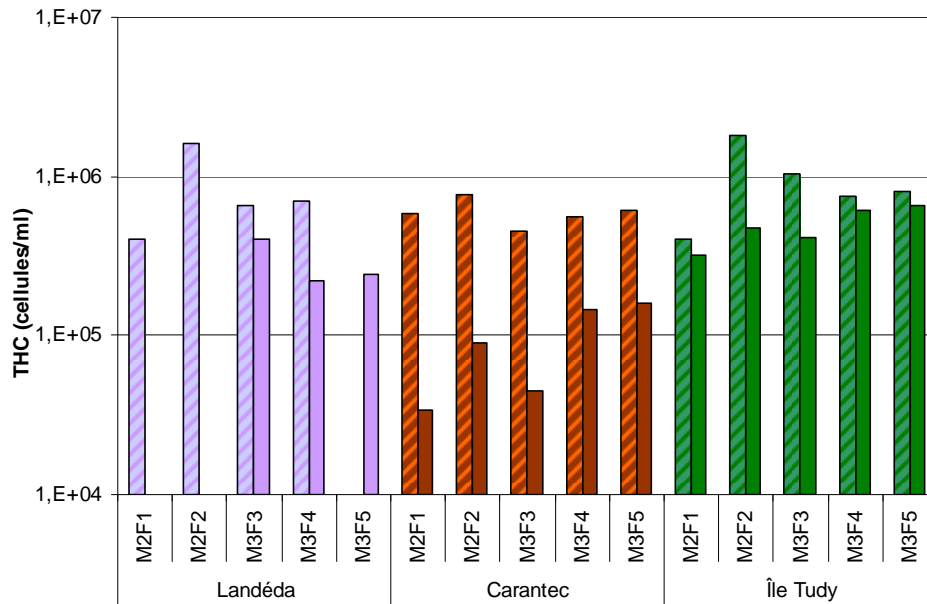


Fig.38: Concentration hémocytaire de l'hémolymphe (THC) en cellules.ml<sup>-1</sup> des 5 familles sur les trois sites en condition témoins (barres rayées) et inoculée par *V. tapetis* (barres pleines).

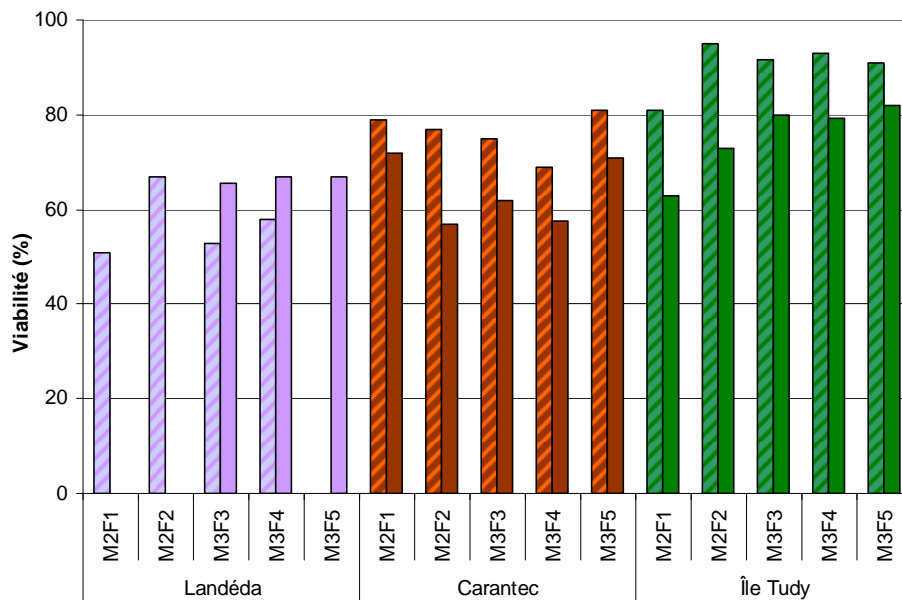


Fig. 39: Pourcentage de viabilité des hémocytes des 5 familles sur les trois sites en condition témoins (barres rayées) et inoculée par *V. tapetis* (barres pleines).

## 4-2 Capacité d'adhérence

Le test d'adhérence *in vitro* a été réalisé sur l'hémolymphe d'animaux témoins ainsi que sur l'hémolymphe des animaux inoculés *in vivo* par *V. tapetis*.

### 4-2-1 Animaux témoins

Après 3 heures d'incubation *in vitro*, le pourcentage de CNA des hémolymphe en contact avec *V. tapetis* est supérieur à celui des hémolymphe en EMSF (Fig. 40).

Pour chaque famille, les pourcentages de CNA en EMSF de l'île Tudy sont inférieurs à ceux de Landéda et de Carantec. Les viabilités hémocytaires observées dans les échantillons de Landéda et de Carantec (Fig. 39) peuvent être mises en cause dans le pourcentage de CNA plus élevé pour ces deux sites que celui de l'île Tudy en condition EMSF.

Les familles M2F1 et M3F4 de Landéda, M2F1 et M3F5 de l'île Tudy ainsi que la famille M3F5 de Carantec montrent les plus forts pourcentages de CNA après l'incubation de 3 heures avec *V. tapetis* (11 ; 14 ; 9.5 ; 13 et 13.5 respectivement).

Les ratios d'adhérence les plus forts se trouvent au niveau des animaux de l'île Tudy et en particulier pour les familles M2F1 et M3F4 avec des valeurs de ratio supérieures à 12.

**Le ratio d'adhérence de la famille M3F3 n'est jamais plus élevé que celui des autres familles ce qui permet de suggérer que pour cette famille, la présence de *V. tapetis* a moins d'effet négatif sur l'adhérence des hémocytes.**



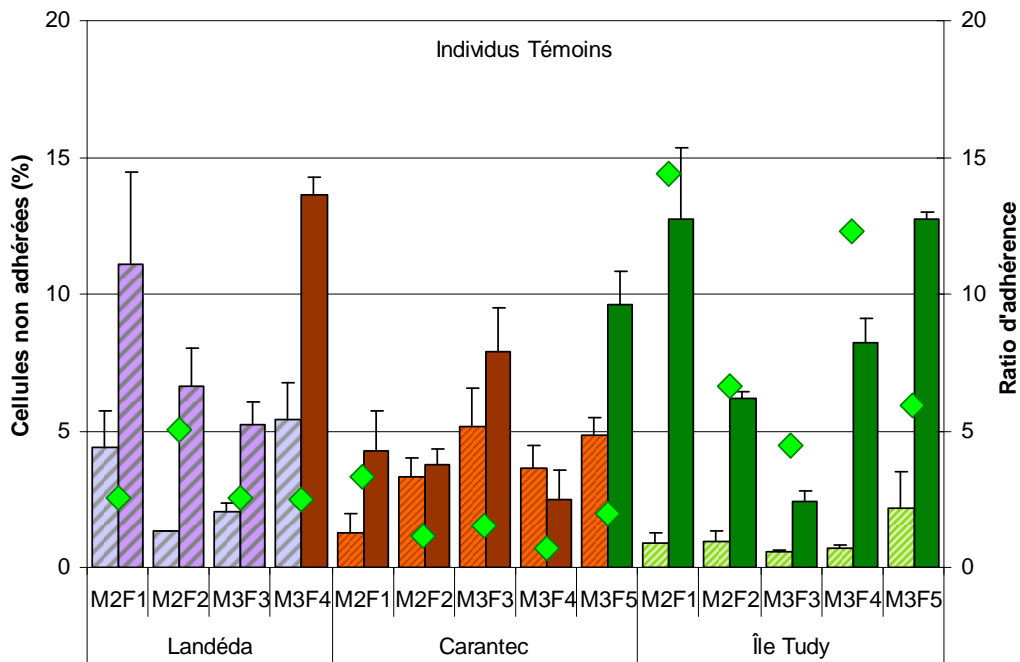


Fig. 40: Pourcentage de cellules non adhérentes après 3 heures d'incubation *in vitro* en condition EMSF (barres claires) ou en contact avec *V. tapetis* (barres foncées) et ratio (losanges verts) sur les familles témoins des trois sites de culture.

#### 4-2-2 Animaux inoculés

Le test d'adhérence a également été réalisé sur les animaux ayant subi une inoculation avec du *V. tapetis*. Les pourcentages de CNA en EMSF sont, sur l'ensemble, inférieurs à 5% (Fig. 70).

La famille M2F1 pour le site de Carantec est celle ayant le plus fort pourcentage de CNA en EMSF et après le contact *in vitro* avec *V. tapetis*.

A l'inverse, le pourcentage de CNA de la famille M2F2 de l'île Tudy est le plus faible. De plus, la famille M3F3 montre le pourcentage le plus élevé de CNA après le contact avec *V. tapetis in vitro*.

Les animaux de l'île Tudy montrent des ratios faibles, alors que pour Landéda, le ratio est proche d'environ 3 pour toutes les familles (Fig. 71). De plus, les familles M2F1 et M2F2 de Carantec ont également un ratio plus élevé (environ 3) que les autres familles. Pour l'île Tudy, l'incubation des hémocytes avec le *V. tapetis* pendant 5 semaines ne semble pas avoir induit une augmentation du pourcentage de CNA contrairement aux animaux témoins. En effet, lorsqu'on compare les ratios des figures 69 et 71, l'île Tudy

montre les ratios les plus forts pour les animaux témoins et les plus faibles pour les animaux inoculés.

Généralement, le pourcentage de CNA en condition EMSF est plus élevé chez les individus inoculés par rapport aux témoins. Ceci renforce l'hypothèse pour laquelle le pourcentage de CNA est un bon biomarqueur de l'état de santé des hémocytes. Ainsi, les sites de Landéda et de Carantec sont les sites aquacoles où les palourdes montrent des déficiences immunitaires pour la palourde japonaise.

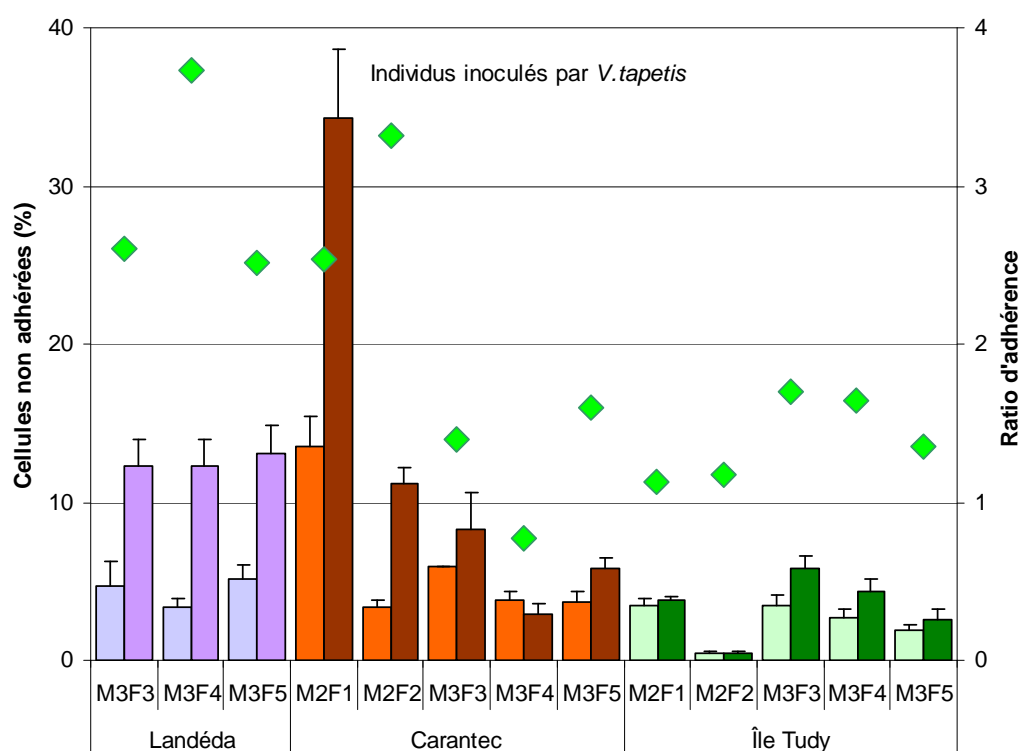


Fig. 41: Pourcentage de cellules non adhérentes après 3 heures d'incubation *in vitro* en condition EMSF (barres claires) ou en contact avec *V. tapetis* (barres foncées) et ratio (losanges verts) sur les familles inoculées avec *V. tapetis* des trois sites de culture.

### 4-3 Oxyde Nitrique

#### 4-3-1 NO des animaux témoins

La figure 42 montre des valeurs de la concentration en NO pour les animaux témoins des sites de Landéda et de Carantec supérieures à celles du site de

l'Île Tudy (entre 10 et 15 $\mu$ M pour les deux premiers sites et inférieures à 5 $\mu$ M pour l'Île Tudy).

Le contact avec le *V. tapetis* n'a induit des augmentations des concentrations que pour le site de Landéda. Le contact de 3 heures a même entraîné des concentrations plus faibles par rapport à la condition EMSF pour les sites de Carantec et de l'Île Tudy. Ainsi, les productions sont significativement positives pour toutes les familles de Landéda et pour la famille M3F4 de l'Île Tudy. Des faibles productions sont observées pour les familles M2F1 et M2F2 de Carantec et M2F2 de l'Île Tudy mais ne sont pas significatives. Les concentrations de NO, plus faibles pour les familles témoins de l'Île Tudy en condition EMSF, témoignent d'un meilleur état de santé. En effet, les hémocytes n'ayant pas été stressés par une inoculation n'ont pas eu besoin de produire du NO. Par contre, les individus des sites de Landéda et de Carantec sont, sur le terrain, déjà impactés puisque Landéda est le berceau de la MAB et la prévalence de la MAB à Carantec est plus élevée qu'à l'Île Tudy.

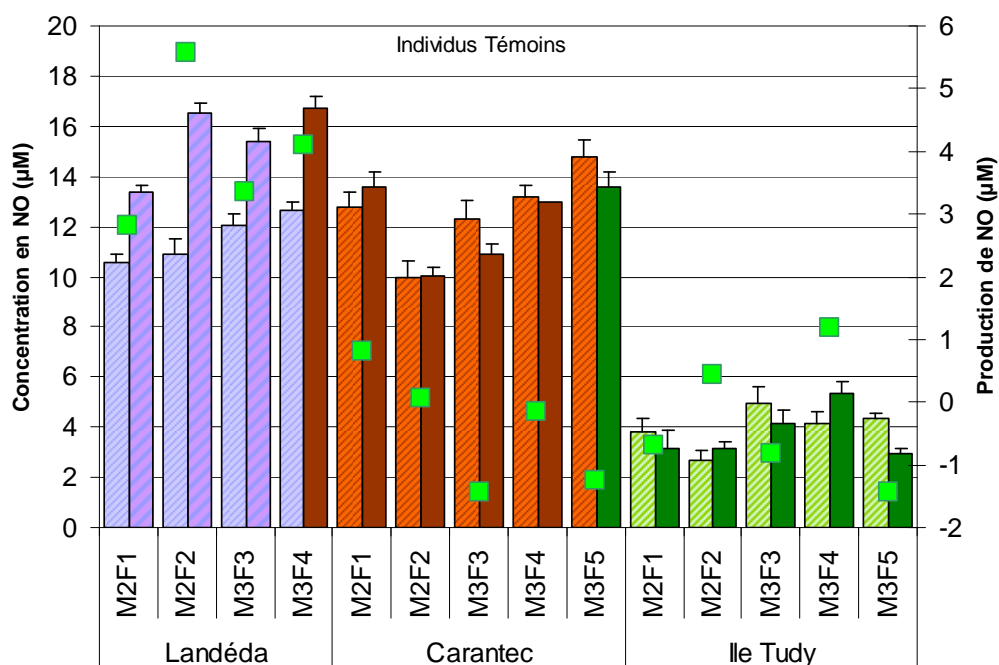


Fig. 42: Concentration de NO ( $\mu$ M) après 3 heures d'incubation *in vitro* en condition EMSF (barres claires) ou en contact avec *V. tapetis* (barres foncées) et production de NO (carrés verts) sur les familles témoins des trois sites de culture.

#### 4-3-2 NO des animaux inoculés

Tout d'abord, la concentration de NO mesurée pour l'ensemble des échantillons est assez élevée et est homogène de l'ordre de 20 $\mu$ M sauf pour les deux familles M2F1 et M2F2 avec des concentrations trois fois plus élevées (Fig. 43). De plus, une légère augmentation de la concentration en NO est observée après un contact de 3 heures avec la bactérie. Les productions sont significatives avec de fortes valeurs pour les familles M2F1 et M2F2 (6 et 9  $\mu$ M respectivement) du site de Carantec.

Les valeurs obtenues pour cette analyse n'atteignent pas les fortes valeurs de NO obtenues pour les géniteurs prélevés avant l'inoculation dans le chapitre précédent sur l'expérimentation de l'effet du prélèvement de l'hémolymphe sur les paramètres hématocytaires (Chap.4, section 4). De plus, les animaux témoins et les animaux inoculés ont été conditionnés en bac en eau non renouvelée. Ainsi, l'hypothèse de l'effet du prélèvement d'hémolymphe sur une augmentation de la concentration de NO est confirmée.

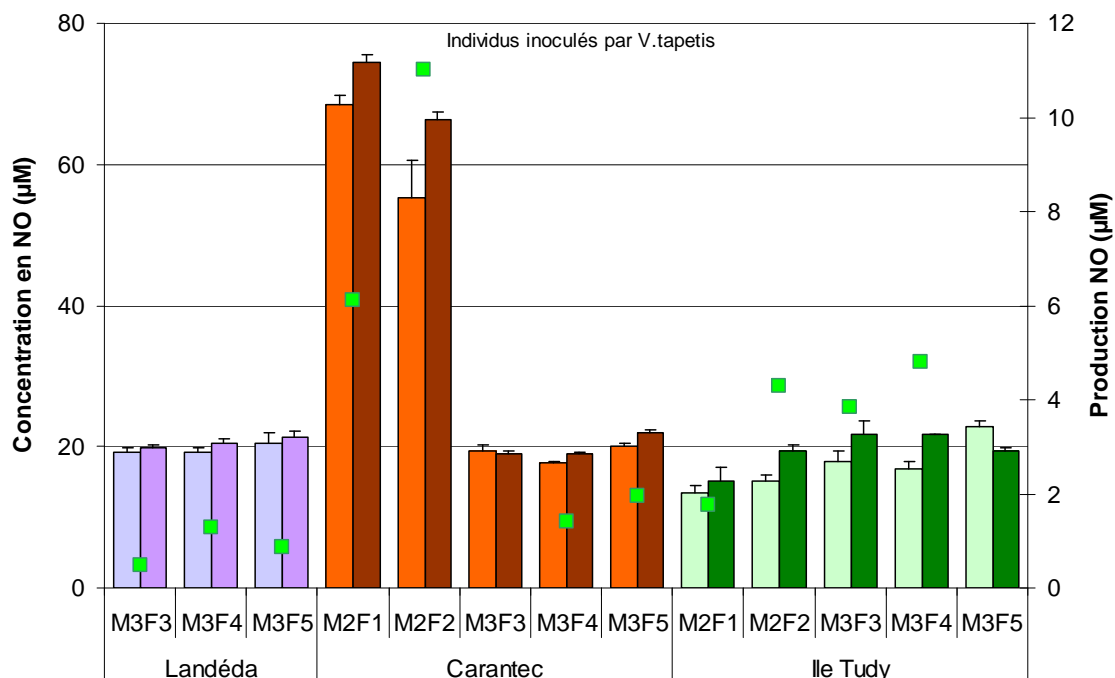


Fig. 43 : Concentration de NO ( $\mu$ M) après 3 heures d'incubation *in vitro* en condition EMSF (barres claires) ou en contact avec *V. tapetis* (barres foncées) et production de NO (carrés verts) sur les familles inoculées avec *V. tapetis* des trois sites de culture.

#### 4-4 Prévalence de la MAB et réparation coquillière

##### **Développement de la MAB**

L'analyse statistique du diagnostic de la MAB n'a pas pu être réalisée sur la famille M3F5 des conditions Témoins de Landéda et de Carantec et sur les familles M2F1 et M2F2 de la condition Inoculées de Landéda à cause de la mortalité sur ces familles durant l'expérimentation ou du trop faible nombre d'individus présents. C'est le cas pour la famille M3F5 des palourdes témoins de Carantec.

Ainsi, seules deux familles de Landéda peuvent être comparées entre les deux conditions Témoins et Inoculées. Cependant, les résultats de la figure 44 montrent clairement des différences du développement de la MAB entre les conditions Témoins et Inoculées, entre les sites de cultures et entre les familles.

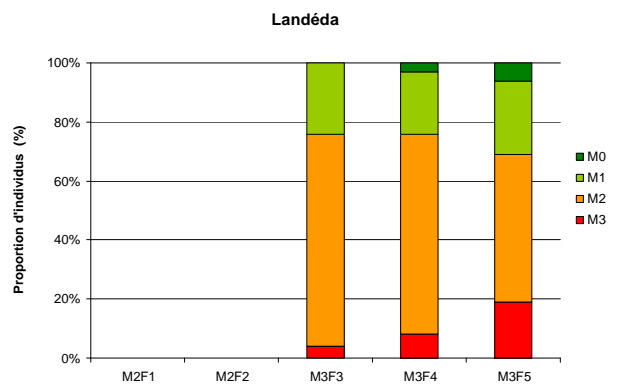
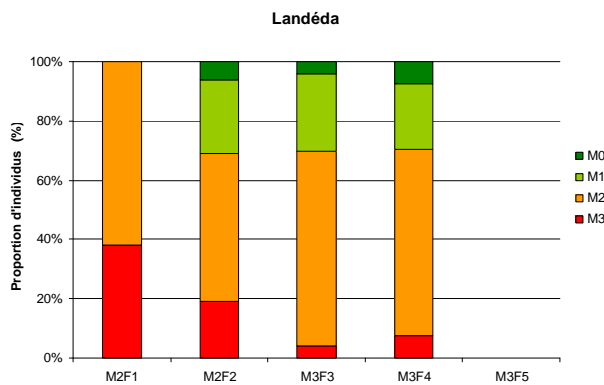
En effet, les palourdes Témoins incubées pendant 5 semaines en eau de mer en laboratoire montrent des fréquences du développement de la maladie croissantes du site de l'île Tudy au site de Landéda, Carantec se situant entre les deux autres sites. Le taux de prévalence varie entre 65% et 100% pour Landéda, entre 60% et 75% pour Carantec et entre 12% à 37% pour l'île Tudy.

Nous notons que la famille M2F1 des Témoins du site de Landéda est très touchée par la maladie alors qu'elle n'atteint pas le stade M3 pour les deux autres sites. Cette famille est totalement morte pendant l'incubation suite à l'inoculation avec la bactérie. Les familles M2F2, M3F3 et M3F4 des deux conditions des sites de Landéda et de Carantec contiennent également des individus très malades. Les individus de l'île Tudy ne montrent pas de stade plus élevé que le stade M2. L'inoculation n'a pas eu d'effet significatif sur le développement de la MAB sur les animaux de Landéda, nous pouvons observer cependant la disparition d'animaux asymptomatiques pour la famille M3F3. Par contre, les animaux inoculés de Carantec et de l'île Tudy ont nettement développé la maladie avec une forte augmentation des pourcentages d'individus en stade M3 pour Carantec et en stade M2 pour l'île Tudy.

## Témoins

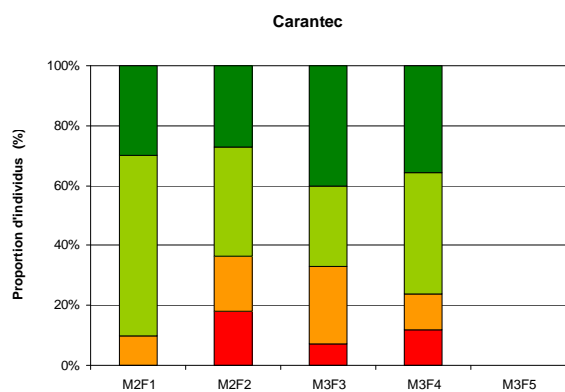
## Inoculés par *V. tapetis*

a

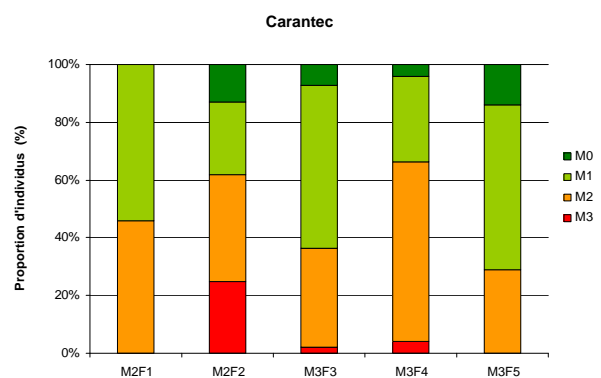


d

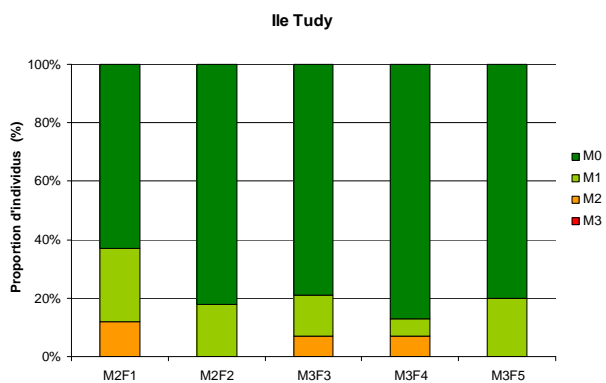
b



e



c



f

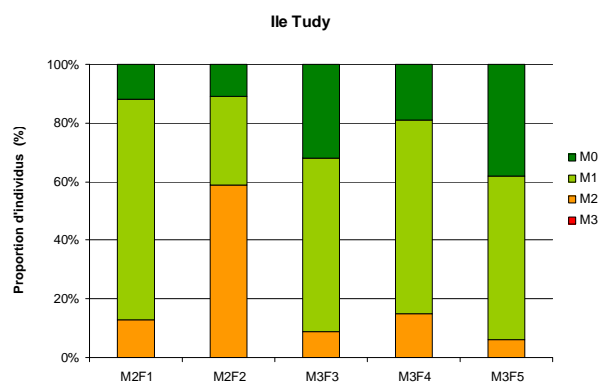


Fig. 44: Histogramme des stades de maladie des familles par site de culture et par condition témoin ou inoculés par *V. tapetis* ; a, b et c témoins de Landéda, Carantec et Île Tudy respectivement et d, e et f inoculés de Landéda, Carantec et Île Tudy respectivement. n>5.

## Réparation coquillière

Les résultats obtenus pour la réparation de la coquille montrent également des variations entre les sites et les familles et entre les témoins et les palourdes inoculées (Fig. 45).

Généralement, il est montré que plus les animaux sont malades plus la réparation est faiblement amorcée. Notre étude le confirme bien pour les trois sites et les deux conditions. De plus, Landéda ne montre pas de différence de réparation entre les deux conditions à l'identique du développement de la MAB. Aucune réparation totale n'y est observée. Ceci est probablement dû au fait que les animaux de Landéda, sur le terrain depuis plus de un an, aient atteint une limite d'infection et n'auraient plus de capacité pour réparer efficacement leur coquille. Ceci met en avant l'intérêt de cette analyse pour l'estimation de l'état de santé des populations de palourdes. En effet, une population qui en EMSF montre d'importants développements de MAB est sensible à son environnement. Il est très difficile d'apporter des conclusions sur les capacités de résistance face à la MAB sur les familles de palourdes de Landéda.

Tandis qu'en se focalisant uniquement sur le site de l'île Tudy, puisque les palourdes ne semblaient pas très affectées par la MAB sur le terrain, nous pouvons ressortir les familles M3F3 et M3F5 comme celles montrant les meilleures capacités de réparation et/ou un moindre développement de la MAB suite à l'inoculation. En outre, la famille M2F2 qui est plus infectée par la MAB montre une bonne réparation. Cette bonne capacité de réparation est également retrouvée chez ces familles M2F2 et M3F3 de Carantec après inoculation.

L'hypothèse de différents mécanismes de lutte contre la maladie est émise ici. En effet, M2F2 présente une meilleure capacité de guérison mais ne montre pas de capacités hémolymphatiques particulières : sa principale défense contre la maladie serait dirigée par des réactions aux niveaux du manteau qui est directement en contact avec le dépôt de conchyoline. L'autre alternative est celle de la défense par l'intermédiaire des hémocytes de l'hémolymphe qui semblent avoir des capacités pour empêcher le développement de la MAB. La capacité hémolymphatique de la famille M3F3 correspondrait à cette alternative car elle est moins malade.

## Témoins

## Inoculés par *V. tapetis*

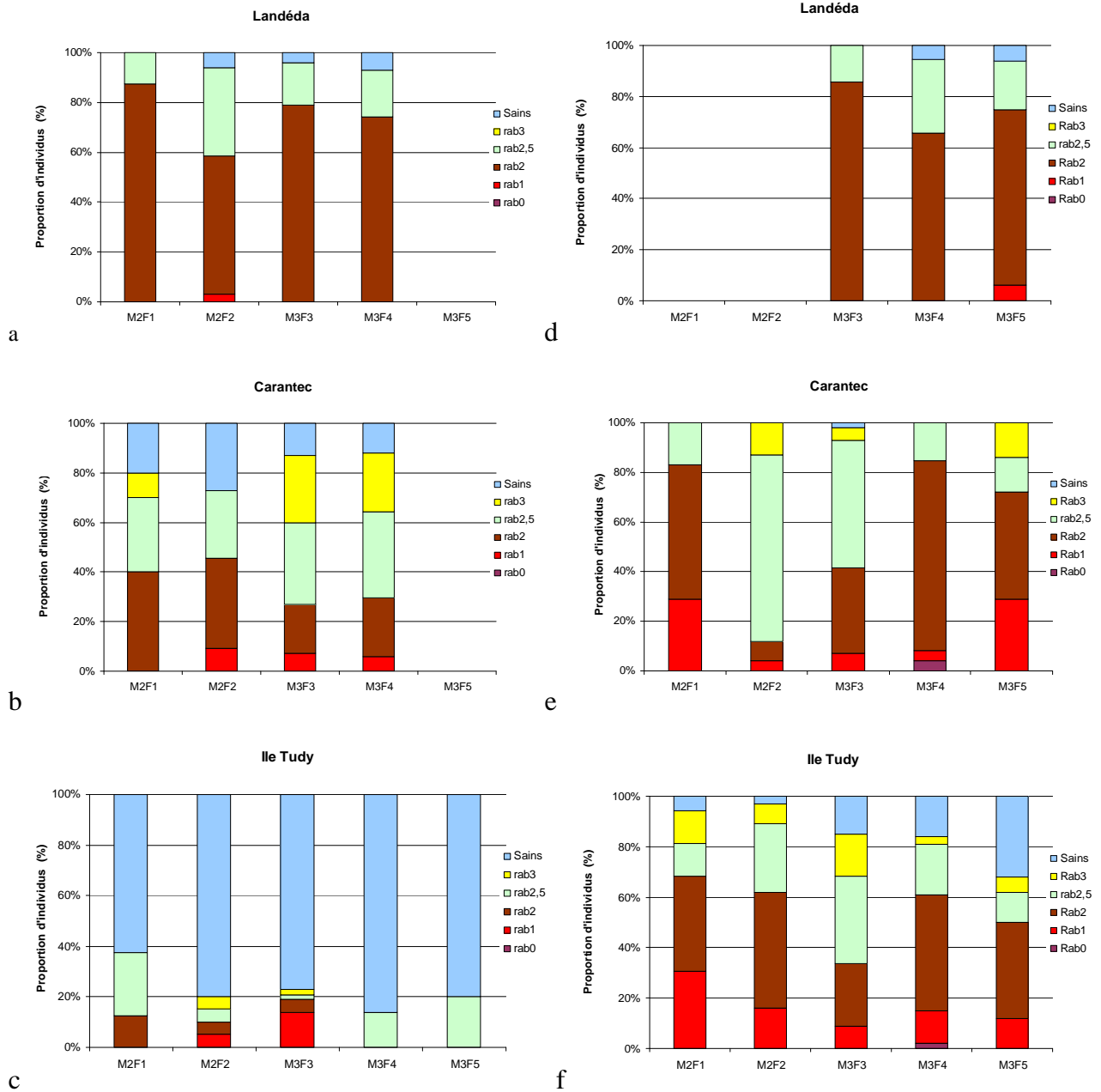


Fig. 45: Histogramme des stades de réparation de la maladie des familles par site de culture et par condition témoin ou inoculée par *V. tapetis*. ; a, b et c témoins de Landéda, Carantec et Île Tudy respectivement et d, e et f inoculées de Landéda, Carantec et Île Tudy respectivement. n>5.



#### 4-5 Expression de transcrits de gènes

Des analyses sur l'expression de quelques gènes transcrits associés à la réponse des hémocytes face à *V. tapetis* ont été effectuées sur les animaux témoins des familles sur les trois sites. Les transcrits identifiés par la banque soustractive décrite dans les travaux de Brulle et collaborateurs (2012) ont été choisis suivant les surexpressions observées dans les hémocytes après un contact avec le *V. tapetis* de 3 heures *in vitro*.

Dans notre étude, une analyse a été effectuée sur les hémocytes de l'hémolymphe prélevée des animaux témoins.

L'expression de deux transcrits de gènes des travaux de Brulle *et al.* (2012) a été mesurée : le Beta Cell translocation gene (B-cell) et le Early growth response gene (Egr). Du fait du nombre trop petit des échantillons analysés (1 pool par famille en triplicat), les tests statistiques n'ont pas pu être traités. Cependant, des tendances nettes apparaissent entre les familles des différents sites.

##### 4-5-1 Gène Beta Cell translocation

L'expression de Gène Beta Cell translocation (B-cell) dans le site de Landéda semble nettement 2 fois plus élevée que dans le site de l'île Tudy (Fig. 46). Seules, les familles M3F3 et M3F4 de l'île Tudy montrent des expressions plus faibles qu'à Carantec. De plus, la famille M2F1 de Landéda montre l'expression la plus importante suivie par la famille M3F4 pour les trois sites. Brulle et collaborateurs (2012) montrent que le contact *in vitro* des hémocytes avec le *V. tapetis* induit une surexpression du gène B-cell. Les plus fortes valeurs obtenues pour Landéda pourraient résulter du fait que les palourdes sont déjà en contact avec le *V. tapetis* contrairement aux animaux de l'île Tudy. B-cell est impliqué dans les processus de différenciation cellulaire codant pour une protéine de la famille des protéines antiprolifératives. Ainsi, le gène pourrait être surexprimé pour faire face à la présence du *V. tapetis*. Par ailleurs, chez les vertébrés, l'induction du B-cell dans les macrophages

semble réprimer la iNOS (Cho et al, 2005). Or, les valeurs d'expression les plus fortes obtenues pour ce gène ont plutôt tendance à correspondre aux valeurs de NO les plus fortes (Fig. 42). Il pourrait exister un mécanisme de trade-off entre la production de NO, agent toxique des bactéries, lorsque la prolifération cellulaire est défavorisée par une sous-expression du gène B-cell. D'autre part, un phénomène général d'immunodépression chez les palourdes très atteintes par la MAB a été mis en évidence (Allam et al., 2000).

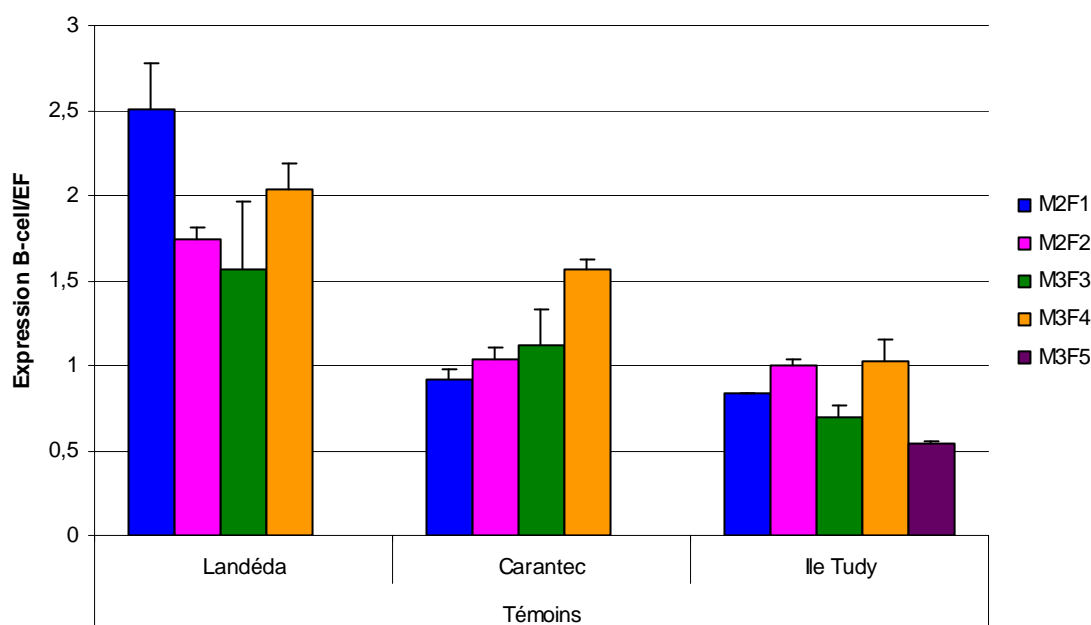


Fig. 46: Moyennes et écarts-type du niveau d'expression des ARNm du gène Beta cell translocation normalisé par le gène de référence facteur d'élongation et relatif au contrôle (famille M2F2 de l'Ile Tudy) sur les familles en condition témoins des sites de Landéda, Carantec et Ile Tudy.

#### 4-5-2 Gène Early growth responses

Les niveaux d'expressions les plus élevés du gène Early growth response (Egr) sont notés pour les familles des sites de Landéda et de Carantec (Fig. 47). L'expression du gène Egr pour la famille M3F4 de l'Ile Tudy est 10 fois et 5 fois moins élevée qu'à Landéda et Carantec respectivement. La famille M2F2 montre des variations d'expression suivant une même tendance que pour la famille M3F3.

Ce gène est impliqué dans les réponses rapides de la prolifération et de la différenciation cellulaire suite à son activation par des facteurs de croissance, des cytokines, LPS et autres facteurs de l'inflammation.

Les travaux de Brulle *et al.*, (2012) montrent une induction de l'expression de l'Egr suite au contact avec le *V. tapetis*. Ainsi, les animaux de l'île Tudy pourraient ne pas avoir de nécessité à exprimer ce gène lorsque *V. tapetis* est absent ou que sa concentration sur le site est très faible.

Les familles M2F1, M2F2 et M3F4 pourraient être plus sensibilisées par les conditions environnementales des sites de Landéda et de Carantec que la famille M3F3.

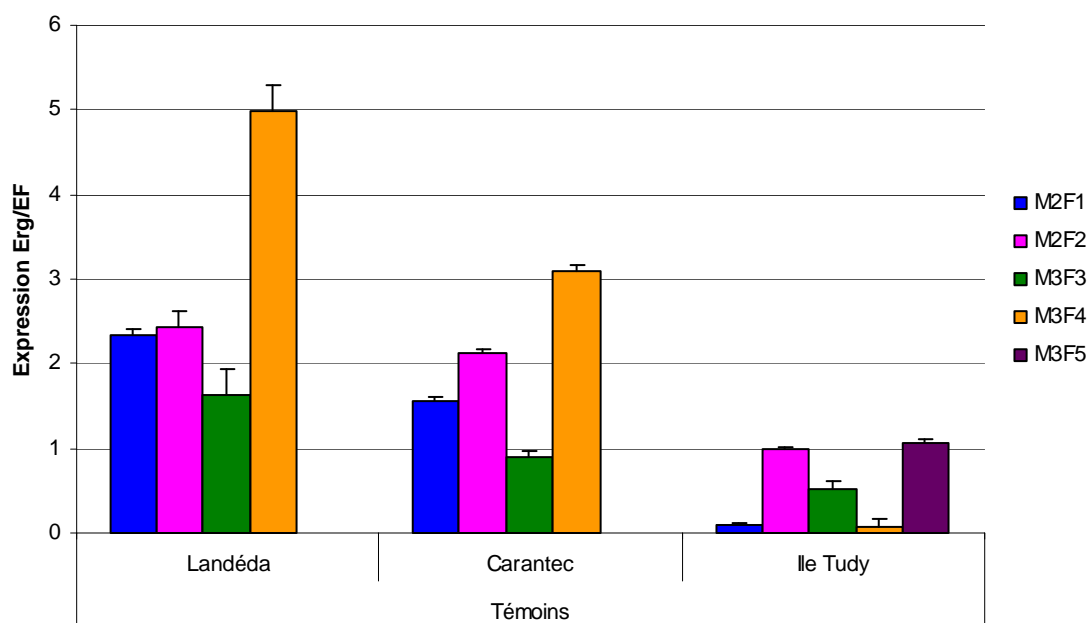


Fig. 47: Moyennes et écarts-type du niveau d'expression des ARNm du gène Early growth response (Egr) normalisées par le gène de référence facteur d'élongation et relatives au contrôle (famille M2F2 de l'île Tudy) sur les familles en condition témoins des sites de Landéda, Carantec et Ile Tudy.

**Il ressort nettement des expressions moindres du site de l'île Tudy pour chacune des familles mais il est difficile d'isoler des caractères significatifs d'une résistance face à la MAB.**

## Conclusion

Globalement, le site de l'Île Tudy montre une prévalence faible de la MAB par rapport aux deux autres sites. Même si la présence de la bactérie causant la maladie n'a été vérifiée sur aucun site au cours de l'étude, nous notons que la prévalence de la MAB est plus tardive et moins forte à l'Île Tudy. De plus, pour ce site, les stades de MAB sont moins développés, les CNA en EMSF et les productions de NO sont plus faibles. Les palourdes de l'Île Tudy montrent de meilleures conditions physiologiques avant l'inoculation expérimentale ce qui permet de différencier les capacités de résistance entre les familles.

Afin de discriminer les familles face à la MAB, le site de l'Île Tudy est le plus approprié. Ainsi, la famille M2F1 serait celle qui expose le plus de facteurs désavantageux face à la MAB : THC et viabilité faibles, fort ratio d'adhérence des témoins, une prévalence plus importante chez les témoins, une réparation coquillière plus faible chez les animaux inoculés et des expressions de gène défavorable à l'intégrité des cellules. A l'inverse, la famille M3F3 paraît moins désavantagée au niveau des paramètres immunitaires car elle révèle des THC et des viabilités élevées, des faibles ratios d'adhérence, des prévalences faibles et de bonnes réparations coquillières.

Ces résultats nous ont mené à entreprendre des productions de familles de seconde génération à partir des animaux de la première génération, analysés au cours de la thèse et cultivées sur le site de l'Île Tudy.

Les résultats descriptifs de cette étude seront ensuite analysés dans le but d'obtenir des données de plasticité au niveau du taux de croissance. Par contre, la défense immunitaire est un trait variable en fonction de l'état physiologique général des animaux lesquels peuvent développer la MAB à plusieurs reprises (Trinkler *et al.*, 2011) et pour certains réparer totalement la coquille endommagée par le dépôt brun.

Enfin, les familles du lot PJ-08-R1 sont sur les trois sites de tailles supérieures aux familles du lot PJ-08-R2. Or, la MAB touchent plus

sévèrement et en particulier la famille M2F1 qui appartient au lot PJ-08-R1. L'hypothèse du coût énergétique dû à la MAB n'est dans ce cas pas vérifiée. Par contre, une origine génétique de la performance de croissance peut être supposée.

**Chapitre 7 :**  
**Identification d'ESTs d'intérêt suite à une**  
**infection *in vivo* de palourdes japonaises,**  
***Ruditapes philippinarum*, par la bactérie *Vibrio***  
***tapetis* et expression différentielle au niveau du**  
**manteau et des hémocytes.**



## Introduction

La production de banques soustractives pour identifier des bases moléculaires sur l'interaction entre l'hôte (palourde) et le pathogène (*Vibrio tapetis*) a été entreprise. Les banques soustractives ont été réalisées afin d'identifier des ESTs différenciellement exprimées correspondant à la réponse précoce du manteau de palourdes suite à un contact d'un jour avec *V. tapetis* dans la cavité palléale. Les banques ont permis d'obtenir 526 clones pour les deux banques 1) Forward : gènes surexprimés (manteau de palourdes infectées comme tester et manteau de palourdes non infectées comme driver) et 2) Reverse : gènes sous-exprimés (manteau de palourdes non infectées comme tester et manteau de palourdes infectées comme driver). Le séquençage des clones a permis d'identifier la fonction putative de protéines codées par les ESTs par la recherche d'homologies dans les banques de données génomiques (GenBank, GenOntology). Les ESTs ont été classées dans les fonctions du métabolisme, du cytosquelette, de la défense immunitaire, dans la transcription, la biominéralisation et l'apoptose.

Le travail a été poursuivi par la réalisation d'une incubation de palourdes, ayant subi ou non une injection de *V. tapetis*, sur une durée de 56 jours. Quatre points de prélèvements de manteau et d'hémolymphe ont été effectués : à T0 avant l'inoculation et après 1 jour, 14 jours et 56 jours d'incubation sur des palourdes inoculées et non-inoculées. Six ESTs impliquées dans le système immunitaire (galectine, big défensine, ferritine, inhibiteur de sérine protéase et allograft inflammatory factor) et dans le processus de biominéralisation (Carbonic Anhydrase-like) ont été sélectionnées.

Après une analyse de l'expression des ESTs sélectionnées par PCR en temps réel, une surexpression de la plupart de ces ESTs a été mise en évidence dans le manteau au cours du développement de la maladie. L'expression des gènes de CA-like et de la serpine est absente dans les hémocytes mais suit progressivement le développement de la MAB dans le manteau.



**Article title:**

2 Differential expression of genes involved in immunity and biomineralization during  
Brown Ring Disease development in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*

4 **En revision pour Journal of Invertebrate Pathology**

6 Fanny Jeffroy, Franck Brulle and Christine Paillard

LEMAR, IUEM, UBO-CNRS UMR 6539, place Copernic Technopole Brest Iroise, 29280

8 Plouzané France

10 Corresponding author. [fannyjeffroy@yahoo.fr](mailto:fannyjeffroy@yahoo.fr) tel : +33 2 98 49 86 61 fax : +33 2 98 49 86 45

12 **Abstract**

14 Severe drop in Manila clams production in French aquacultured fields since the end  
of the 80's is associated to Brown Ring Disease (BRD). This disease, caused by the  
16 bacteria *Vibrio tapetis*, is characterized by specific symptoms on the inner face of the  
shell. Diseased animals develop conchiolin deposit to enrobe bacteria and form new  
18 calcified layers on the shell. Suppression subtractive hybridization was performed to  
identify genes differentially expressed during the early interaction of *V. tapetis* and  
20 *R. philippinarum*. Results revealed 301 unique genes differentially expressed during  
*V. tapetis* challenge. Several candidates involved in immune and biomineralization  
22 processes were selected from libraries. Transcriptional expression of selected  
candidates was determined in hemocyte and mantle tissues and revealed spatial  
24 and temporal variations.

26 **Keywords:** Manila clam, SSH, gene expression, *Vibrio tapetis*, Brown Ring Disease.

28 **Highlights:**

. The first transcriptomic investigation in mantle tissue from manila clams during *in vivo* *V. tapetis* infection.

. Expression of genes involved in immunity and biomineralization were modulated  
32 during disease development

. Two specific genes identified in mantle tissue were not expressed in hemocytes  
34 during infection

36 1- Introduction

38 Microbial diseases such as vibriosis have been well-studied in aquacultured animals  
(Paillard et al., 1994 ; Lacoste et al., 2001, Travers et al., 2008 ; Goarant et al.,  
40 2006 ). Studies were performed to better understand cellular and humoral  
mechanisms of defense responses in bivalves (Ford et al., 1993 ; Allam et al., 2006 ;  
42 Mateo et al., 2009). Additionally, several molecular approaches such as SSH  
(suppression subtractive hybridization) (Diatchenko et al., 1996) were used to identify  
44 differentially expressed genes during bacterial or protistan infections (Tanguy et al.,  
2004 ; De Lorgeril et al., 2005, Perrigault et al., 2009, Morga et al., 2011). The Brown  
46 Ring Disease (BRD) affects populations of Manila clams along the North East coast  
of Europe (Paillard, 2004). This disease is caused by gram-negative bacterium,  
48 *Vibrio tapetis* (Paillard and Maes 1990). A previous molecular study using SSH was  
performed on hemocytes from *R. philippinarum* incubated *in vitro* with *V. tapetis*  
50 (Brulle et al., 2012). This study led to the identification of genes involved in immunity  
such as B-cell translocation gene and early growth protein factor. One characteristic  
52 of the BRD is the formation of a brown deposit of conchiolin on the inner shell at the  
edge of the mantle, the main organ involved in the shell formation. Resistance to  
54 BRD development is characterized by shell repair processes with brown deposits  
formation encapsulating bacteria (Trinkler et al., 2011). Mantle tissue is therefore  
56 essential in the defense of *R. philippinarum* against *V. tapetis*. The first step of *V.*  
*tapetis* colonization is observed 72h post injection on the periostracal lamina  
58 secreted by the mantle (Paillard et Maes, 1995a). Increases in total hemocytes count  
and in lysozyme activity were described 24h post injection. High total hemocytes  
60 count was also observed between days 7 and 15 post injection (hemocytosis) and  
was followed by an immunodepression after one month (Oubella et al., 1993; Allam  
62 et al., 2000). One flaw of our previous molecular study was characterized by the *in*  
*vitro* approach used to identify differentially expressed genes of *R. philippinarum* in  
64 response to *V. tapetis*. To complete this molecular approach of *R. philippinarum*  
defense response to *V. tapetis* and overcome *in vitro* limitation, a second SSH was  
66 performed on mantle tissues during an *in vivo* infection, to identify and characterize  
defense mechanisms involved in the early development of BRD in clams after 1 day  
68 of *V. tapetis* challenge. Candidates were thereafter selected from SSH libraries and

70 their transcriptional variations were analyzed in mantle tissues and hemocytes during  
56 days.

## 72 2- Materials and methods

### 74 2-1 Biological materials

76 Three hundred adult Manila Clams (36-40 mm) were collected from the  
Lanveur Bay, Brittany, in France. Clams were acclimated in tanks with circulating  
78 seawater and held at 14°C for 1 week before experiment.

*V. tapetis* CECT4600 strain was grown on Zobell medium during 24h at 18°C.  
80 The bacterial suspension was rinsed with sterile seawater and the concentration  
determined by spectrophotometry at 490nm absorbance.

82

### 2-2 Infection experiment

84

Experimental infection was carried out by injecting 100µl of a *V. tapetis* suspension  
86 ( $5 \times 10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup>) per individual in the pallial cavity with a sterile syringe according to  
Paillard and Maes (1990). Infected clams were maintained in three 50-L tanks with  
88 aerated water for 56 days. 20 animals sampled after 1 day were used for the  
generation of subtractive libraries.

90 Control clams were inoculated with 100µl of sterile seawater in the pallial  
cavity and maintained in three separate 50-L tanks. Before the challenge (time To),  
92 hemolymph and mantle samples from 20 animals were collected. Approximately 20  
animals were collected at each sampling time (To, Day 1, Day 14 and Day 56).

94

### 2-3 Tissue sampling

96

Hemolymph was withdrawn by inserting a needle in the hinge through the  
98 adductor muscle of clams. Mantle samples were dissected preferably in the area  
where the syringe was inserted for the challenge, usually associated to the apparition  
100 of the first BRD symptoms. All clam tissues were removed and shells were kept for  
BRD diagnostics. Mantle and hemocytes were individually homogenized with Tri-  
102 reagent and stored at -80°C until RNA extraction.

104           2-4 Brown Ring Disease diagnosis

106   At each incubation time, BRD development or CDS (Conchiolin Deposit Stage) and  
shell repair stages were determined from animal shells according to the classification  
108   developed by Paillard and Maes (1994). Briefly, CDS 0 was associated to  
asymptomatic clams and 7 gradual stages (CDS 1 to CDS 7) represented the  
110   different disease development stages. Signs of repair were also determined by  
different SRS (Shell Repair Stage) stages: from SRS 0 (no repair) to SRS 3 (totally  
112   repair) according to Paillard and Maes (1994). An additional stage, SRS 2.5, was  
added and corresponded to a near complete recovery from BRD, with only few small  
114   persisting black points (Paillard, 2004).

116           2-5 RNA extraction

118   After one day of *V. tapetis* challenge, RNA was isolated from mantle tissues of three  
animals per condition (bacteria challenged and control) using Tri reagent (Invitrogen,  
120   Cergy-Pontoise, France) according to manufacturer instructions. Total RNA from  
individual clam was pooled according to each condition and mRNA was isolated from  
122   the total RNA using the PolyAtract mRNA isolation System (Promega, Madison, WI,  
USA) according to manufacturer instructions. Quality and quantity of mRNA samples  
124   were determined with a NanoDrop spectrophotometer and Agilent Bioanalyser (Agilent  
Technologies, Waldbronn, Germany).

126

          2-6 Suppression Subtractive Hybridization

128

          Two micrograms of mRNA were used as templates for the SSH following the  
130   PCR-select cDNA subtraction kit procedure (Clontech) (Diachenko et al., 1996).  
Forward subtraction was carried out using mRNA from mantle tissue of *V. tapetis*  
132   challenged clams as the tester and mRNA from mantle tissue of control clams as the  
driver. Reverse subtraction was performed as the opposite of the forward subtraction.  
134   Differentially expressed genes were cloned into pGEM-T vector (Promega) and  
transformed in XL1-Blue competent cells (Agilent Technology). For each library, 528  
136   white colonies were grown on LB/ampicillin/IPTG/XGal plates, picked randomly and

138 cultured into agar plates supplied by AGTC Biotech Company. A total of 1056 clones  
139 were sequenced by AGTC Biotech Company using the M13-FP primer. Sequences  
140 were analyzed using the Seqman II<sup>TM</sup> software (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA).  
141 Unique sequences (>100pb) (from contigs and singletons) were subjected to BlastN  
142 and BlastX analysis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) against the non-redundant  
143 nucleotide and protein databases of NCBI. Homologies with E-value <1e<sup>-4</sup> were  
144 considered as significant. Gene function was inferred from the AmiGO classification  
(<http://www.geneontology.org>).

## 146 2-7 Real time PCR analysis

148 Specific primers were designed using the Primer3 software (Rozen and  
149 Skaletsky, 2000). Total RNA was extracted from mantle and hemocyte as previously  
150 described (section 2-3). Total RNA were treated with RQ1 DNase (1U/μg total RNA,  
Promega) to remove genomic DNA contaminant.

152 First strand cDNA were synthesized from 4μg of DNase-treated total RNA  
153 using the Oligo(dT)<sub>18</sub> primer and the RevertAid<sup>TM</sup> HMinusFirst Strand cDNA  
154 Synthesis Kit (Fermentas) according to manufacturer protocol.

155 Real time PCR was performed in triplicates with 3μl cDNA (1:50 dilution) in a total  
156 volume of 20μl using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in 96-  
157 microwell plates. Each well contained 1X Absolute<sup>TM</sup> Blue QPCR SYBR<sup>®</sup> Green ROX  
158 Mix (ABgene) and 75nM of each primer. Oligonucleotide primer sequences used to  
159 amplify specific gene products are listed in table 1. Cycling conditions were defined  
160 by: 15 minutes activation at 95°C followed by 40 cycles (denaturation 15s at 95°C,  
161 elongation 20s at 55°C and extension 30s at 72°C). Melting curve were also  
162 performed (95-60°C) by decreasing the temperature of 0.5°C every 10s. Negative  
163 controls (cDNA free) were included to rule out DNA contamination. For each primer  
164 pair, PCR efficiency was determined by the slope of standard curves obtained from  
165 serial dilutions analysis of cDNA (1:5 to 1:20000). Amplification efficiency were  
166 calculated according to the following equation  $E=10^{(-1/slope)}$  (Pfaffl, 2001). Expression  
167 of candidate genes was normalized to the reference gene Elongation Factor 1 alpha  
168 (EF1a) that presented a low variation coefficient (2.9%) and normalized with the  
169 calibrator (mantle tissue at To). Primers of EF1a were previously determined by  
170 Brulle and collaborators (2012). Fold units were calculated using the equation:

Expression=  $\frac{[(E_{\text{gene of interest}})^{\Delta Ct_{\text{gene of interest(calibrator-sample)}}]}{[(E_{\text{reference gene}})^{\Delta Ct_{\text{reference(calibrator-sample)}}}]}$  where E are the gene amplification efficiencies and Ct are the threshold cycle crossing. For each tissue samples (mantle and hemocytes), ratio were calculated between infected clams and no-infected clams.

## 2-8 Statistical analysis

Ratios were used to evaluate difference between bacteria challenged and seawater challenged clams and compared to the control at To (expression =1). Results were presented as mean values with standard deviations. Data were compared using Student t-test with at significant difference at  $P < 0.05$ .

182

## 3- Results

184

### 3-1 EST sequencing and general characteristics of SSH libraries

186

A total of 1056 clones from forward and reverse SSH libraries were sequenced (526 clones for each library). 1020 sequences were associated to 301 unique genes identified from 74 contigs and 227 singletons representing a redundancy of 70.7% (Genbank accession numbers JKI982911 to JK983228 and table 1). BlastX analysis of ESTs revealed 301 ESTs matching with known genes in the GenBank database including 222 ESTs with putative functions (44.3% and 37.5% for Reverse library and Forward library respectively) (Fig 1). ESTs were assigned in 6 major cellular functions using GO ([www.geneontology.org/](http://www.geneontology.org/)): energetic metabolism, immunity, cytoskeleton organization, transcription and translation processing, apoptosis processing and biomineralization. A large number of ribosomal protein homologs were identified in the forward and reverse libraries.

198

### 3-2 BRD diagnosis

200

No mortality was observed during the experiment. At Day 1, none of the clams exhibited BRD symptoms on the shell (Fig 2). Signs of BRD development appeared at Day 14 in the group of infected clams and were characterized by early

204 development stages (CDS1 and CDS2). At Day 56, disease symptoms affected 75%  
of infected clams whereas only 20% clams shown a light BRD development (CDS1)  
206 in the control group.

Signs of shell repair were noticed during the experiment (Fig. 3). No SRS 0  
208 was observed in experimental clams. Few clams exhibited early shell repair stage  
(SRS 1) at Day 14. Repair processes increased during the experiment with  
210 observations of 30% and 100% SRS 2.5 - 3 at Day 56 for *V. tapetis* infected clams  
and control, respectively.

212

### 3-3 qPCR

214

Variations of transcript expression of several candidates were investigated  
216 during *V. tapetis* challenge. Six candidate genes were selected from the SSH  
libraries according to their physiological function. Candidates were involved in  
218 immunity (galectin, ferritin, big defensin, allograft inflammatory factor (AIF), serine  
proteinase inhibitor) and biomineralization processes (carbonic anhydrase-like (CA-  
220 like)). For each candidate gene, forward and reverse primers were designed from  
each EST clones sequenced from in the SSH to obtain a specific amplicon (Table 2).

222

Results demonstrated effects of *V. tapetis* challenge in gene expressions of  
224 manila clams with different trends according to candidates (Fig. 4).

In mantle tissues (Fig. 4a), high expression was noted for CA-like and galectin  
226 genes in challenged clams compared to controls with a 9 fold and more than 5 fold  
increase after 14 days for CA-like, and galectin, respectively. Big defensin and serpin  
228 genes were characterized by an acute expression at day 1 post challenge with  
expressions more than 5 folds and 2 folds higher in challenged clams compared to  
230 controls for the big defensin and serpin genes respectively. Decreases were  
observed for the galectin and serpin while CA-like and ferritin expression continued  
232 to go up. For the others genes, except AIF and galectin, they stayed over-expressed  
up to 56 days. AIF gene did not show high variation along the infection experiment. It  
234 showed an under-expression only at day 1.

In hemocytes, expression level was not similar to the pattern of expression  
236 observed in the mantle (Fig. 4b). First, it was not possible to amplify in hemocytes a  
fragment of the CA-like and serpin genes identified in mantle SSH. Galectin and

238 ferritin genes were under-expressed in infected clams after 1 and 14 days.  
Transcripts of galectin and ferritin genes appeared to be elevated in hemocytes at  
240 Day 56 by high expression level (13 folds and 4 folds). AIF gene showed constantly  
an under-expression and defensin gene a constant over-expression of their level, all  
242 along the experiment.

#### 244 4- Discussion

246 In this study, two suppressive subtractive libraries from Manila clam mantle  
were generated to identify genes specifically differentially expressed in response to  
248 *Vibrio tapetis* challenge. Results led to the identification of ESTs associated with  
early bacterial response (immunity, apoptosis, cytoskeleton and biomineralization)  
250 with 11% and 41% of the total ESTs identified in the forward and the reverse  
libraries, respectively.

252 Very recently, a study was performed to identify genes involved in the  
response of *R. philippinarum* hemocytes to *V. tapetis* during a 3 hours *in vitro*  
254 challenge (Brulle et al., 2012). The present *in vivo* study completes knowledge of  
processes occurring at the molecular level and involved in the BRD defense of *R.*  
256 *philippinarum*.

In our experiment, development of conchiolin deposit and shell repair processes, 2  
258 features of the BRD, were observed after 14 days of incubation with *V. tapetis*. These  
results are in accordance with previous observations (Paillard et Maes, 1995b; Allam  
260 et al, 2000; Paillard, 2004; Trinkler et al., 2011).

To generate our cDNA libraries, we selected the mantle epithelium, the tissue involve  
262 in shell secretions. Indeed, previous studies demonstrated a rapid colonization of  
shell secretions by *V. tapetis* within 12 h after interaction. Our results demonstrated  
264 expression variations of immune genes in the mantle, place of biomineralization  
processes, during the development of BRD.

266 In response to *V. tapetis*, we hypothesized that Manila clams genes involved in  
immunity would be differentially expressed. Our study shows that at least 5 genes  
268 coding for proteins involved in immune response had expression modulated by *V.*  
*tapetis*.

270 The first of them is the Big-defensin. Defensins belong to a family of  
antimicrobial peptides that are released from the granulocytes in plasma. Defensins



272 are involved in response against pathogens in various shellfish such as the bay  
scallop *Argopecten irradians*, the mussel *Mytilus galloprovincialis* and oysters  
274 *Crassostrea gigas* and *C. virginica* (Mitta et al, 2000; Bachère et al, 2004; Seo et al,  
2005). Big defensin was also characterized in *R. philippinarum* (Zhao et al, 2010) and  
276 associated to hemocyte responses during *Vibrio anguillarum* infection. Our results  
showed a higher expression level of big defensin after 1 day in the mantle compared  
278 to hemocytes characterized by a constant expression during the experiment.

Galectins (galactose binding lectin) belong to the family of lectins and are  
280 involved in host defense. Galectin from *R. philippinarum* recognizes sugar residues  
on *V. tapetis* cell walls and promotes agglutination of bacteria (Kim et al, 2008).  
282 These authors also demonstrated that tandem repeat galectins from foot tissue of *R.*  
*philippinarum* were 120 folds over-expressed compared to the control group after two  
284 days of contact with *V. tapetis*. Our results are in accordance with this study since we  
observed induction of galectin transcripts in mantle tissue at 14 days after *V. tapetis*  
286 challenge. Expression of galectin was also induced in *A. irradians* and in *C. virginica*  
hemocytes after pathogenic challenge (Song et al, 2010; Tanguy et al, 2004) and  
288 was identified in cDNA libraries from *R. philippinarum* hemocytes after *in vitro*  
challenge with *V. tapetis* (Brulle et al, 2012). In hemocytes, the highest expression  
290 level of galectin was observed 56 days after bacterial challenge. This delay of gene  
expression in hemocytes compared to trends obtained in mantle tissues could be  
292 explained by the time required for bacteria to reach hemolymph from the initial  
infection place in mantle tissue.

294 Our investigations also led to the identification of a transcript with homologies  
to the allograft inflammatory factor (AIF). AIF is a modulator factor during  
296 macrophages activation. This gene has not been well studied in invertebrate but  
induction of AIF was reported during wound repairs and cytokine-mediated  
298 responses in marine sponges (Kruse et al, 1999). Recently, AIF from *R.*  
*philippinarum* was characterized by Zhang and coworkers (2010). These authors  
300 demonstrated a constitutive expression of AIF in various tissues including mantle and  
hemocytes. Additionally, AIF transcripts from *R. philippinarum* was repressed 1 day  
302 post infection and highly induced during the following 3 days in response to *V.*  
*anguillarum* challenge. Conversely, our results showed a constant decrease of the  
304 AIF expression in hemocytes of bacteria challenged clams during the 56-day  
experiment while a light increase was observed after 1 day in mantle tissue. This

306 difference in AIF gene expression between *V. tapetis* and *V. anguillarum* challenges  
could be due to *V. tapetis* pathogenicity and *V. anguillarum* non-pathogenicity to  
308 clams.

During quantification of a gene associated to the defense processes, the  
310 ferritin revealed that expression was induced in concert with BRD development.  
Ferritin plays a role in iron detoxification and leads to iron regulation in cells. Iron  
312 donates electrons for generation of oxidative radicals via the Fenton reaction.  
Bacteria require iron availability for their proliferation (Wyckoff et al, 2007). Hence,  
314 ferritin can participate to the host defense preventing the iron access to bacteria and  
protect cells from oxidative stress (Beck et al, 2002). Ferritin expression level  
316 increased continuously in mantle tissue during the experiment whereas it was  
repressed during the 14 first days in hemocytes of clams challenged with *V. tapetis*.  
318 Travers and coworkers (2010) reported a decrease of ferritin transcripts in muscle  
tissue of abalone after 10 days of challenge with *Vibrio harveyi* and was followed by  
320 an induction of ferritin among surviving abalones. Our results exhibited similar trends  
with an increase of ferritin transcripts in challenged clams after 56 days. According to  
322 our results and literature, variations of expression observed for this gene are likely  
involved in the non-specific response against *Vibrio* ssp.

324 No transcripts of the serine proteinase inhibitor gene (serpin) were identified in  
hemocytes, suggesting that this gene is not expressed in hemocytes. While  
326 hemocytes are strongly involved in immunity, expression of serpin in mantle could  
represent the first defense of clams and initiate the immune response of *R.*  
328 *philippinarum* against invaders. Indeed, La Peyre and coworkers (2010)  
demonstrated that serpin in *C. virginica* inhibited the proliferation of the parasite  
330 *Perkinsus marinus* associated to Dermo disease. Moreover, polymorphism of this  
serpin, mainly present in gills and digestive glands, could be associated to the  
332 disease resistance (Yu et al, 2011). Activity of clam serpin could prevent action of  
bacterial serine proteases. Serine proteases are involved in the phenol-oxidase (PO)  
334 reactions inducing the melanin formation. Our results showed a decrease of serpin  
expression in mantle tissue from the 14<sup>th</sup> day which could be associated to processes  
336 of conchiolin deposition. The brown ring development allows the *V. tapetis*  
encapsulation in organic shell matrix. Hence, serpins could be under expressed to  
338 increase PO reactions.

One main characteristic of the BRD is that diseased animals develop their  
340 defense such as nacrezation in two steps : conchiolin deposit and shell process  
repair to enrobe bacteria (Paillard and Maes, 1995a). Indeed, *V. tapetis* is known to  
342 disrupt the host biomineralization processes to make easier its colonization (Trinkler  
et al., 2011). Then new calcified layers on their inner shell are formed.  
344 Thus, it was not surprising to identify a homolog of the carbonic anhydrase (CA)  
named carbonic anhydrase-like (CA-like). This protein is known to be involved in to  
346 the biomineralization of bivalve shells (Miyamoto et al, 1996). The high level in CA-  
like mRNA expression in mantle could be associated to the shell repair process (Fig.  
348 3) (Paillard et Maes, 1994). Calcium crystals are laid down during the shell repair  
process (Trinkler et al, 2011). Moreover, CA activity was not associated to shell  
350 growth in mussels (Medakovic et al, 2000). These results suggested an involvement  
of CA in the formation of conchiolin deposit which is often associated to the  
352 nacrezation process (Cheng, 1967). Hemocytes expressing CA were strongly  
suspected to participate in the shell formation (Mount et al, 2004). However, CA-like  
354 gene was not expressed in hemocytes in our study. Our results suggest a specific  
expression of CA-like transcripts in mantle tissues and is likely different from CA  
356 genes observed in hemocytes.

Differences in expression levels were observed between the mantle and  
358 hemocytes samples indicated a specificity expression of two genes (CA-like and  
serpin) according to the tissue. Moreover, differences in expressions levels of these  
360 two genes between each sampling time showed temporal variations which could be  
associated to BRD development and the shell repair processes.

362 This study was the first transcriptomic investigation of interaction between *V.*  
*tapetis* and *R. philippinarum* in mantle epithelium. Using suppression subtractive  
364 hybridization, this work generated new transcriptomic data associated to the host  
response and identified key processes linked to the BRD. Involvement of CA-like in  
366 the mantle is particularly interesting since it could be associated with shell formation  
and repair processes.

368

## **Acknowledgment**

370 The region Bretagne (GIS VIVREM) and the ANRT (CIFRE) supported in part this  
research bourse. Thanks to Nelly Le Goic and Adeline Bidault-Toffin for their help in  
372 clam sampling and to Mickael Perrigault for English correction.

## References

- 374 Allam, B., Ford, S.E., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible  
376 and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following in vitro challenge. *Fish  
and Shellfish Immunology* 20, 374-383.
- 378 Allam B. , Paillard C., Auffret M., 2000. Alterations in Hemolymph and Extrapallial Fluid Parameters in  
the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, Challenged with the Pathogen *Vibrio tapetis*. *Journal of  
380 of Invertebrate Pathology* 76, 63-69.
- Bachère E., Gueguen Y., Gonzalez M., de Lorgeril J., Garnier J., Romenstand B., 2004. Insights into  
382 the antimicrobial of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the Oyster *Crassostrea  
gigas*. *Immunological reviews*, 198, 149-168.
- 384 Beck, G., Ellis, T.W., Habicht, G.S., Schluter, S.F., Marchalonis, J.J., 2002. Evolution of the acute  
phase response: iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an  
386 echinoderm ferritin molecule. *Developmental and Comparative Immunology* 26, 11-26.
- Brulle F., Jeffroy F., Madec S., Nicolas JL and Paillard C. 2012. Transcriptomic analysis of *Ruditapes  
388 philippinarum* hemocytes reveals cytoskeleton disruption after *in vitro* *Vibrio tapetis* challenge.  
*Developmental and Comparative Immunology*. 38, 368-376.
- 390 Cheng, T.C., 1967. Internal defense mechanisms. *Advances in Marine Biology*. 5, 60-80.
- De Lorgeril, J., Gueguen, Y., Goarant, C., Goyard, E., Mugnier, C., Fievet, J., Piquemal, D., Bachère,  
392 E., 2008. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a  
selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. *Molecular Immunology* 45, 3438-3445.
- 394 Diatchenko L., Lau Y., Campbell P., Chenchik A , F, M., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K.,  
Gurskaya N., Sverdlov ED., Siebert P., 1996. Suppression subtractive hybridization: a method  
396 for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Nad.  
Acad. Sci.* 93, 6025-6030.
- 398 Ford, S.E., Kanaley, S.A., Littlewood, D.T.J., 1993. Cellular Responses of Oysters Infected with  
*Haplosporidium nelsoni*: Changes in Circulating and Tissue-Infiltrating Hemocytes. *Journal of  
400 Invertebrate Pathology* 61, 49-57.
- Goarant, C., Merien, F., 2006. Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome  
402 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry. *Journal of  
Microbiological Methods* 67, 27-35.
- 404 Kim, J.Y., Kim, Y.M., Cho, S.K., Choi, K.S., Cho, M., 2008. Noble tandem-repeat galectin of Manila  
clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus  
406 olseni*. *Developmental and Comparative Immunology* 32, 1131-1141.
- Kruse M. , Steffen R., Batel R., Muller I.M., MullerW.E., 1999. Differential expression of allograft  
408 inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase during auto- and allograft response in  
marine sponges. *J Cell Sci* 112, 4305-4313.
- 410 Lacoste A., Jalabert F., malham S., Cueff A., Gélébart F., Cordevant C., Lange M., Poulet SA., 2001.  
*A Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea  
412 gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Organ* 12, 139-145.

414 La Peyre, J.F., Xue, Q.-G., Itoh, N., Li, Y., Cooper, R.K., 2010. Serine protease inhibitor cvSI-1  
 potential role in the eastern oyster host defense against the protozoan *parasite Perkinsus*  
*marinus*. *Developmental and Comparative Immunology* 34, 84-92.

416 Mateo, D.R., Siah, A., Araya, M.T., Berthe, F.C.J., Johnson, G.R., Greenwood, S.J., 2009. Differential  
 in vivo response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: Changes  
 418 in cell structure, numbers and adherence. *Journal of Invertebrate Pathology* 102, 50-56.

Medakovic, D., 2000 Carbonic anhydrase activity and biomineralization process in embryos, larvae  
 420 and adult blue mussels *Mytilus edulis*. *Helgol Mar Res* 54, 51-56.

Mitta G., Vandenbulcke F., Roch P., 2000. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel  
 422 innate immunity. *FEBS LETTERS* 486, 185-186.

Miyamoto H, Miyashita T, Okushima M, Nakano S, Morita T, A., M., 1996. A carbonic anhydrase from  
 424 the nacreous layer in oyster pearls. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9657-9660.

Morga, B., Arzul, I., Faury, N., Segarra, A.I., Chollet, B., Renault, T., 2011. Molecular responses of  
 426 *Ostrea edulis* haemocytes to an in vitro infection with *Bonamia ostreae*. *Developmental and*  
*Comparative Immunology* 35, 323-333.

428 Mount, A., Wheeler A. P., Paradkar R. P., Snider D., 2004. Hemocyte-Mediated Shell Mineralization in  
 the Eastern Oyster, *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 297-  
 430 300.

Oubella R, Maes P., Paillard C., M., A., 1993. Experimentally induced variation in hemocyte density for  
 432 *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis Aquat Organ* 15, 193-197.

Paillard, C., Maes, P., 1990. Etiology of the brown ring disease in *Tapes philippinarum*: pathogenicity  
 434 of a *Vibrio* sp. [Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*:  
 Pathogénicité d'un *Vibrio* sp.]. *C.R. Acad. des Sci., Serie III* 310 (1), 15–20.

436 Paillard, C., Maes, P., Oubella, R., 1994. Brown ring disease in clams. *Annual Review of Fish*  
*Diseases* 4, 219-240.

438 Paillard C., Maes P., 1994. Brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*:  
 establishment of a classification system. *Dis. Aquat. Res.* 19, 137-146.

440 Paillard, C., Maes, P., 1995a. The Brown Ring Disease in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*: I.  
 Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *Journal of Invertebrate Pathology* 65, 91-  
 442 100.

Paillard, C., Maes, P., 1995b. The Brown Ring Disease in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*:  
 444 II. Microscopic Study of the Brown Ring Syndrome. *Journal of Invertebrate Pathology* 65, 101-  
 110.

446 Paillard, C., .2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes*  
*philippinarum* and *Ruditapes decussates*. *Aquat. Living. Resour.* 17, 467-475.

448 Perrigault M., Tanguy A., Allam B., 2009. Identification and expression of differentially expressed  
 genes in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, in response to quahog parasite unknown  
 450 (QPX). *BMC GENOMICS* 10.

Rozen S., Skaletsky H., 2000. Primer3 on the www for general users and for biologists programmers. .  
 452 *Methods Mol. Biol* 132, 365-386.

- 454 Seo, J.-K., Crawford, J.M., Stone, K.L., Noga, E.J., 2005. Purification of a novel arthropod defensin  
from the American oyster, *Crassostrea virginica*. Biochemical and Biophysical Research  
Communications 338, 1998-2004.
- 456 Song X , Zhang H, Zhao J , Wang L, Qiu L , Mu C, Liu X , Qiu L , Song L . 2010. An immune  
responsive multidomain galectin from bay scallop *Argopectens irradians*. Fish and Shellfish  
458 Immunology 28, 326-332.
- Tanguy A., Guo X., Ford S E., 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus*  
460 challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. Gene 338, 121-131.
- Travers MA. , Meistertzheim AL. , Cardinaud M., Friedman C. S. , Huchette S., Moraga D. , Paillard  
462 C., 2010. Gene expression patterns of abalone, *Haliotis tuberculata*, during successive  
infections by the pathogen *Vibrio harveyi*. j invertebr pathol 105, 289-297.
- 464 Travers M-A. , Le Goic N., Huchette S. , Koken M., Paillard C., 2008. Summer immune depression  
associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio*  
466 *harveyi* infection. Fish and Shellfish Immunology 25, 800-808.
- Trinkler N, Bardeau J-F, Marin F, Labonne M, Jolivet A, Crassous P, Paillard C, 2011. Mineral phase  
468 in shell repair of Manila clam *Ruditapes philippinarum* affected by brown ring disease. Dis Aquat  
Organ 93, 149-162.
- 470 Wyckoff E. E., May A.R., Payne S.M., 2007. Iron acquisition in *Vibrio cholerae*. Biometals, 405-416.
- Yu H., He Y., Wang X., Zhang Q., Bao Z., Guo X., Polymorphism in a serine protease inhibitor gene  
472 and its association with disease resistance in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin).  
Fish and Shellfish Immunology 30, 757-762.
- 474 Zhang L., Zhao J., Li C., Su X., Chen A., Li T., Qin S., 2011. Cloning and characterization of allograft  
inflammatory factor-1 (AIF-1) from manila clam *Venerupis philippinarum*. Fish & Shellfish  
476 Immunology 30, 148-153.
- 478 Zhao J., Li C, Chen A , Li L , Su X, Li T., 2010. Molecular Characterization of a Novel Big Defensin  
from Clam *Venerupis philippinarum*. PLoS ONE 5

## Figure captions

480

Table 1: General characteristics of SSH libraries and ESTs obtained from mantle of  
482 *R. philippinarum*. Forward library: enriched for genes expressed by infected clams.  
Reverse library: enriched for genes expressed by non-infected clams.

484

Table 2: Informations such as identification, sequence (5'-3'), melting temperature  $T_m$   
486 and amplicon size for the various primers used for quantitative real time PCR.

488 Figure 1: Functional classification of sequences obtained in SSH libraries made from  
*Ruditapes philippinarum* mantle one day after challenge with *Vibrio tapetis*.

490

Figure 2: Disease development in Conchiolin Deposit Stage (CDS) during experiment  
492 within non-infected clams (T) and infected clams (Inf). CDS 0 corresponds to healthy  
and completely repaired shells. N=20 individuals

494

Figure 3: Shell repair development in SRS (Shell Repair Stages) during experiment  
496 within non-infected clams (T) and infected clams (Inf). SRS 0 corresponds to  
diseased clams that have not repaired. N=20 individuals

498

Figure 4: Relative expression by quantitative real time PCR of selected transcripts  
500 from SSH expressed in a ratio between infected and non-infected clams. Expression  
levels were normalized to EF1- $\alpha$  and were relative to control (Day 0; expression=1).  
502 a) Mantle in full bars, b) hemocytes in lined bars. Mean  $\pm$  SD, n=3). \* mean significant  
differences with the control. N=3 technical replicates.



Table 1

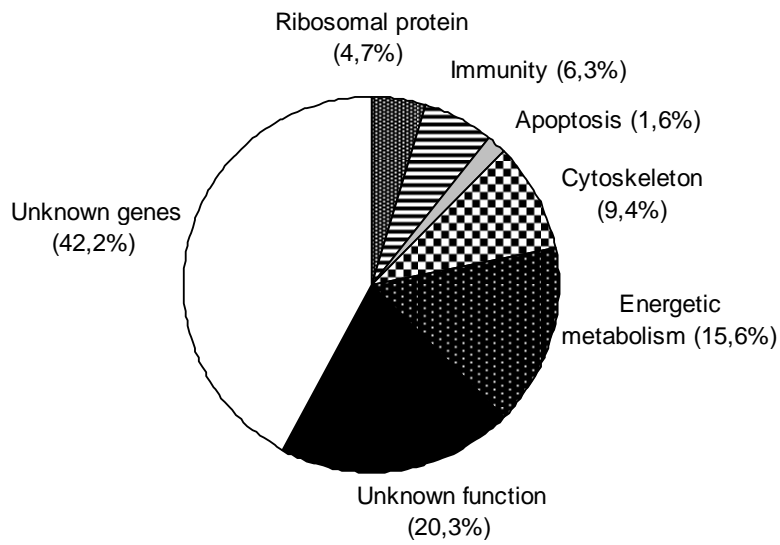
	Total	Forward	Reverse
Total number of clones sequenced	1030	510	520
Total number of EST sequences analyzed	1020	505	515
Unique gene object	301	64	237
Contigs	74	23	51
Singletons	227	41	186
Total number of EST with no match to database	112	15	80
Redundancy (%)	70,7	87,3	54

506

508 Table 2

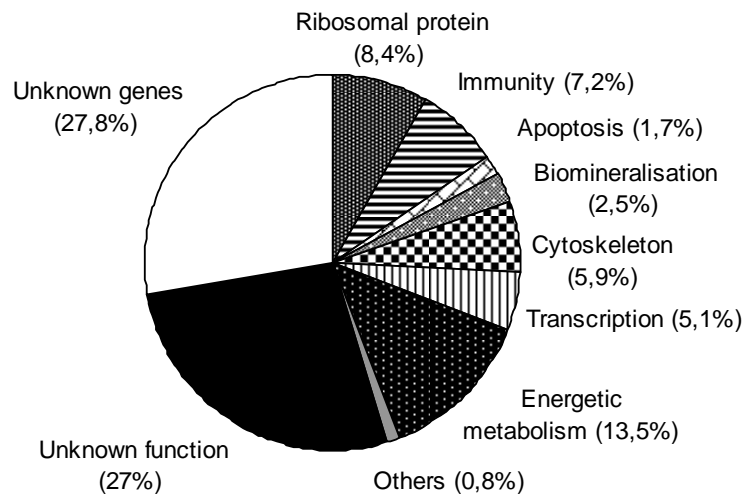
Gene name	Primer	sequence (5'-3')	Tm (°C)	length (pb)	
Carbonic anhydrase-like	CA-likeRpF	GTGCCCCGAGGAAATATGAGA	55	110	
	CA-likeRpR	GATCTGCTGCCAAAGATGGT	55		
Galectin	Gal-RpF	CACTATTCCGTGTCGGTGAA	55	135	
	Gal-RpR	ACCACCTCCTCCATGTTCAA	55		
Ferritin	Ferritin-RpF	CCTAGACGAGTCAATGTGGT	55	172	(Brulle et al., 2012)
	Ferritin-RpR	CGGCGTTACAACACTAGAAAAG	55		
Big defensin	Defensin-RpF	TGTCCAGGCATCACAATAG	55	184	(Brulle et al., 2012)
	Defensin-RpR	ACAGCTTTAGCACTCAACG	55		
Allograft Inflammatory Factor	AIF-RpF	GCCTGCACGTGTATTTAATC	55	155	
	AIF-RpR	ACGCTTCTAAATGGTCTGTG	55		
Serine protease inhibitor	serpin-RpF	TCTGACAGGTGCCTTTGTTG	55	118	
	serpin-RpR	GGCCAGCAGCCTACTATTGA	55		

### Forward library

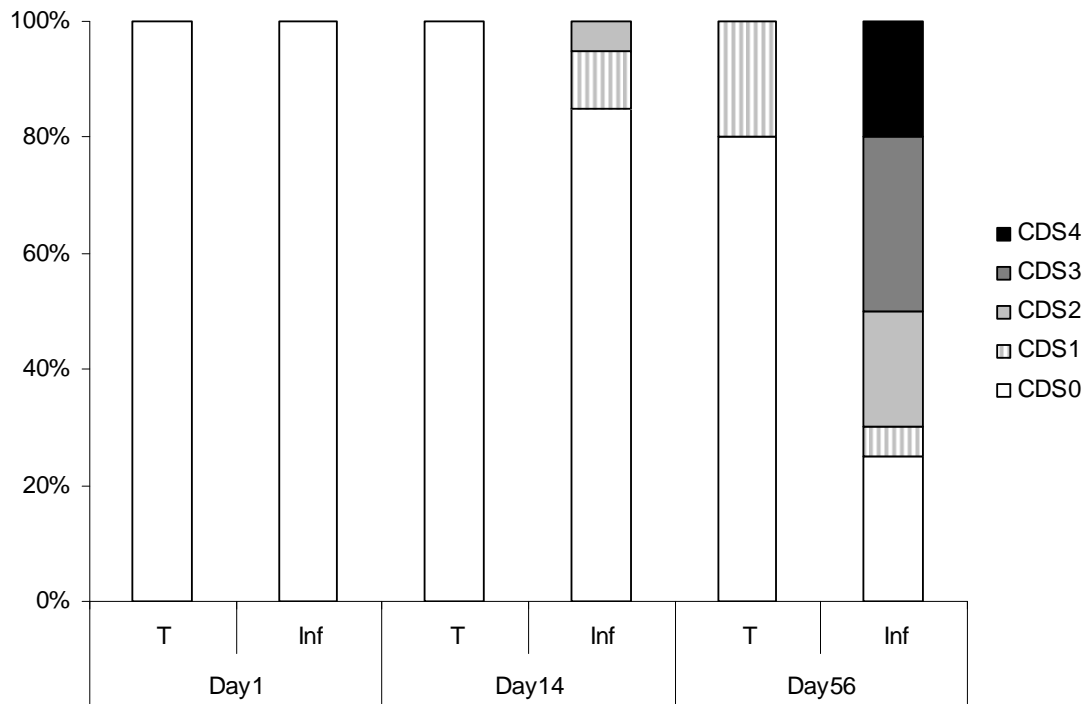


510

### Reverse library

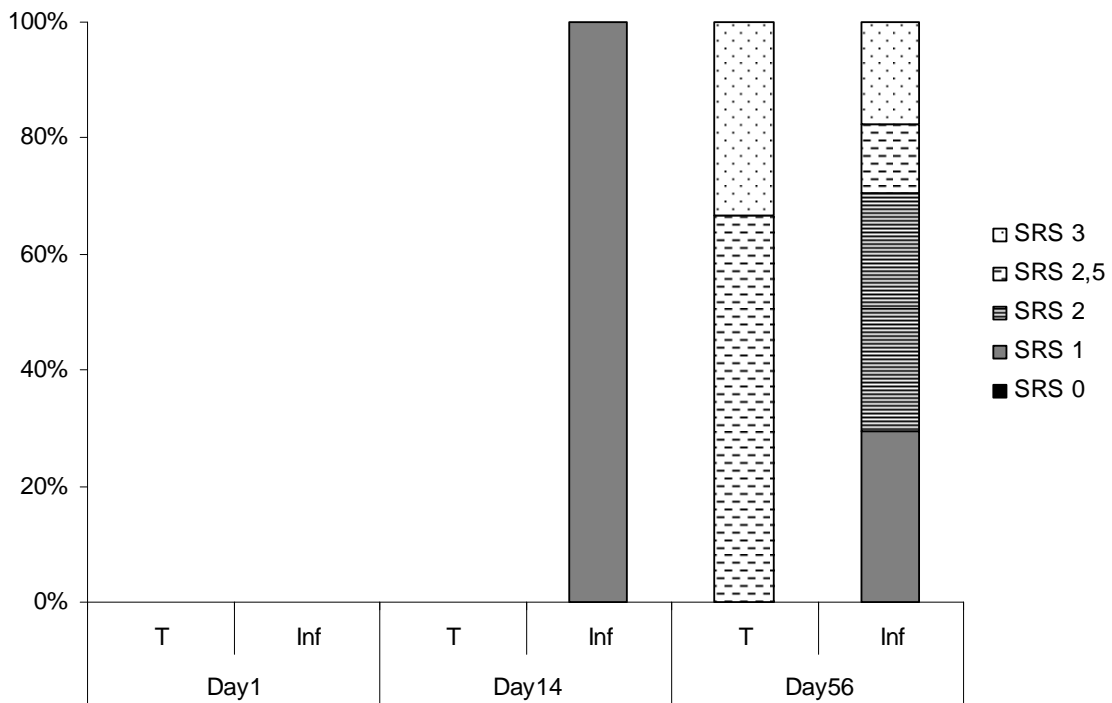


512 Figure 1

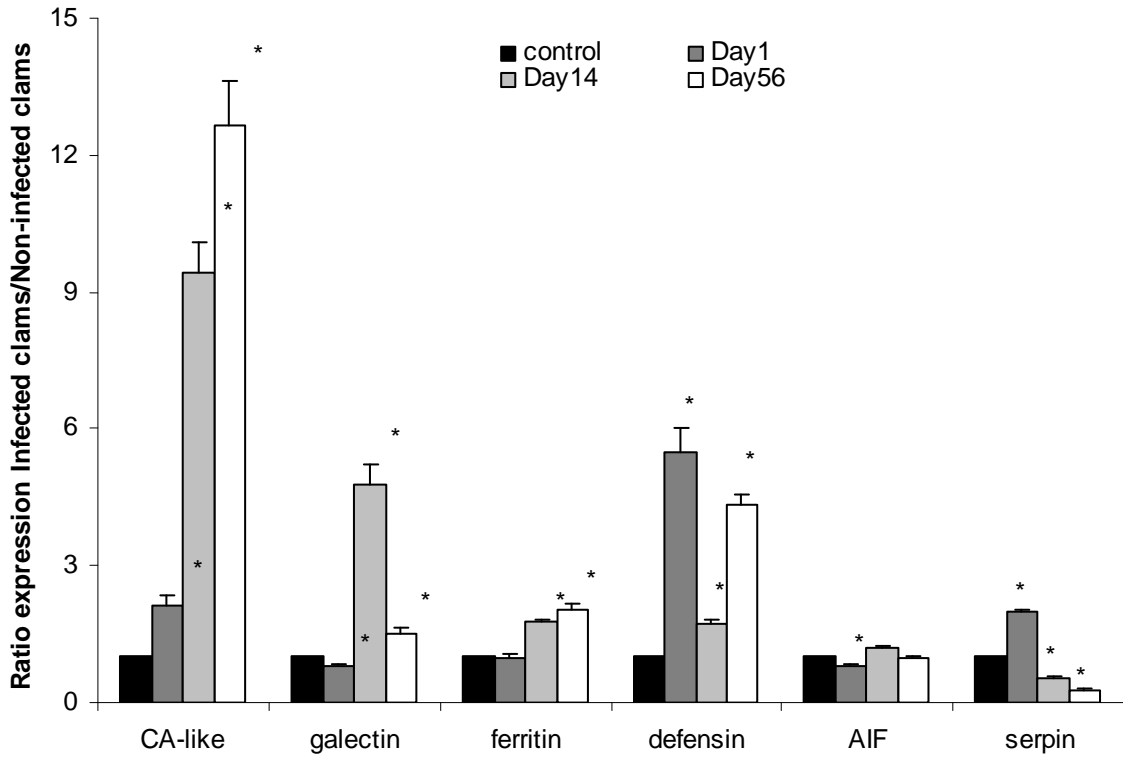


514 Figure 2

516



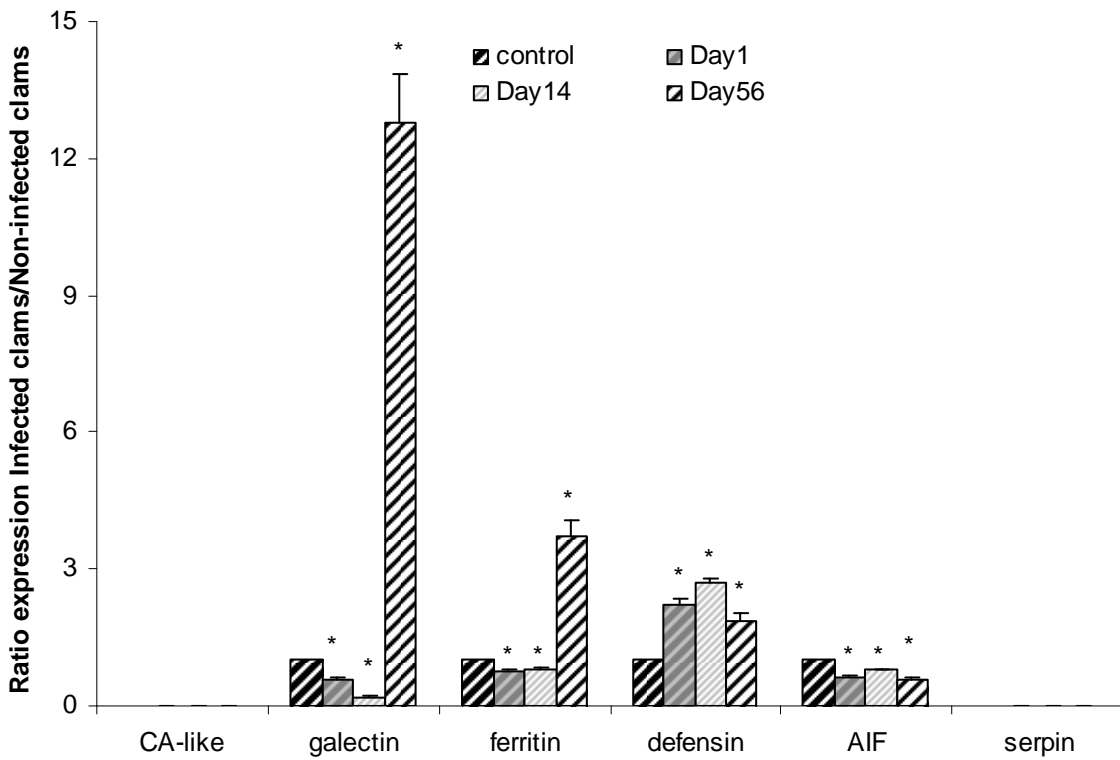
518 Figure 3



520

a)

522



524

b)

526 Figure 4



## **Conclusion générale et perspectives**

L'objectif principal de la thèse était de caractériser des familles résistantes à la maladie de l'anneau brun. Pour cela, une production de familles à partir de géniteurs provenant de deux lots identifiés comme résistante et sensible à la MAB depuis plusieurs générations a été entreprise. Cependant, nous ne sommes pas parvenus à un nombre élevé de familles permettant des robustesses d'analyse. Néanmoins, sur les 16 familles produites, 7 ont été analysées au cours de cette thèse.

### **Analyses phénotypiques des géniteurs et effet sur leur état de santé.**

La première sélection de géniteurs a été réalisée à la suite d'une inoculation avec *V. tapetis*. Ce processus a permis d'induire la MAB comme cela l'a été dans de nombreuses études (Paillard, 1992, Allam *et al.*, 2000a, 2001, Trinkler *et al.*, 2010) et surtout de distinguer les animaux suivant leur caractère asymptomatique ou de réparation totale de la coquille. Mais du fait de la forte mortalité avant la date des pontes, nous n'avons pas pu exploiter les géniteurs inoculés, anesthésiés, diagnostiqués et biopsiés comme nous l'espérons. Afin de minimiser l'impact expérimental sur la santé des futurs géniteurs, une autre technique de sélection a porté sur des analyses de l'hémolymphe. Ces résultats ont permis de mettre en avant l'importance de facteurs combinés tel que la numération hémodocytaire, la viabilité et la phagocytose élevées et une capacité d'adhérence et une concentration de NO des hémocytes à l'état basal faible. Grâce à nos mesures individuelles sur un grand nombre d'individus (50 à 100 individus par lot), nous avons pu observer que seule une petite partie des individus validaient tous les paramètres. Malheureusement, il semble que le prélèvement d'hémolymphe ait un impact sur le développement gonadique et/ou sur la capacité à émettre des gamètes. La combinaison des mortalités obtenues par la sélection par l'inoculation de la bactérie et des pontes sans succès, nous avons eu des difficultés à obtenir des familles.

Il serait alors peut être plus judicieux soit d'inoculer les animaux avec une solution plus faible de *V. tapetis* c'est-à-dire  $10^5$  bactéries, soit de ne prélever un morceau d'organe pour extraire l'ADN qu'une fois les pontes effectuées. Les croisements seraient alors plus contrôlés suivant les génotypes des

microsatellites. Ainsi, le coup énergétique dû à la cicatrisation suite à la biopsie serait réduit car il est mis en cause dans les mortalités et les échecs de ponte.

D'autres alternatives sont envisagées pour améliorer le protocole expérimental de sélection de géniteurs (Tab. 24).

Tab. 17: Récapitulatif des avantages et inconvénients des méthodes expérimentales pour la sélection de géniteurs et ses alternatives.

Type d'expérimentation	Prélèvement d'hémolymphe sur le terrain puis animaux laissés sur le terrain	Inoculation au laboratoire pour observer la MAB ou la résistance des animaux
Avantages	Biomarqueurs multiples de l'état de santé	Biomarqueur le plus représentatif de la MAB
Inconvénients	Site de récolte des animaux potentiellement contaminé par le <i>V. tapetis</i> . Mesures sur le cytomètre au laboratoire	Anesthésie, Diagnostic, Biopsie
Méthodes à développer	Utilisation d'un cytomètre sur le terrain (Ile Tudy) ou dans le bateau (îles Chausey)	Diminuer la charge bactérienne de l'inoculation. Utilisation de fluides palléaux pour extraire l'ADN en fin d'incubation.

### Relation entre la concentration de NO et la capacité d'adhérence en présence de *V. tapetis*.

La production de l'oxyde nitrique par les hémocytes chez la palourde japonaise a été démontrée par des tests *in vitro* et *in vivo* après des inoculations. *V. tapetis* semble moduler la production de NO des cellules des hémocytes. De plus, la présence d'un inhibiteur de l'enzyme synthétisant le



NO provoque une diminution de la capacité d'adhérence des hémocytes. Des phénomènes d'arrondissement des hémocytes ont été démontrés après un contact avec le *V. tapetis* (Choquet et al., 2003). Ainsi, les hémocytes qui restent adhérents malgré la présence du *Vibrio* seraient les principaux producteurs du NO. Cependant, le gène de la NOS n'a pas été identifié chez les palourdes. Une recherche de cette enzyme pourrait mener à mieux comprendre le processus de défense par la production de NO et de cibler les zones de production du NO en localisant l'enzyme dans les différents tissus de la palourde. Une étude du polymorphisme de cette enzyme pourrait permettre d'associer des allèles avec différentes activités enzymatiques liées à la résistance à la MAB.

### **Mise en évidence de la relation du phénotype de la coquille avec l'apparement.**

Les palourdes sont des coquillages bénéficiant d'un panel de couleurs et d'ornementations par des tâches de toutes formes sur les coquilles externes. Les palourdes d'élevage sont issues de croisements entre de nombreux géniteurs (environ 60). La diversité allélique de microsatellites paraît assez élevée ce qui montre que la production contrôlée fait face aux trop fortes consanguinités. Lorsque les familles ont été produites, les coquilles ont rapidement montré des caractéristiques telles que la couleur générale de fond, des rayures et des points. Le plus impressionnant a été de voir la similarité de ses caractéristiques sur des individus d'une même famille. Ceci rappelle le caractère héréditaire de la couleur et des ornementations de l'huître *C. gigas* suggéré par Evans et ses collaborateurs (2009). Ainsi dans notre étude, 11 regroupements de patterns de coquilles de palourdes ont été distingués pour les 7 familles produites. Cet outil de détermination de parenté pourrait être mis en pratique sur les palourdes de deuxième génération obtenues en 2010. Les familles de la deuxième génération présentent des groupes de couleurs mais les génotypes de microsatellites n'ont pas encore été testés.

### **Détermination de la capacité de résistance de la MAB des familles**

Les familles ont été soumises à des contacts avec *V. tapetis in vitro* et *in vivo*. Les résultats ont montré que les paramètres immunitaires, les développements et les réparations de la MAB de deux familles s'opposaient. **En effet, la famille M2F1 montre des capacités de résistance faibles et à l'inverse, la famille M3F3 expose des capacités de résistance élevées.** Il aurait été intéressant de comparer les comportements hémocytaires de l'hémolymphe avec ceux des fluides extrapalléaux pour chaque famille. Allam et ses collaborateurs (2000a) ont montré des variabilités au niveau des fluides extrapalléaux (THC, viabilité, concentration des protéines, activité lysozymique) qui sont en contact plus proches des dépôts de conchioline. Cependant, le volume de fluides extrapalléaux par individu limite le nombre de tests pouvant être entrepris. C'est pourquoi l'étude sur ces fluides n'a pas été effectuée.

Les familles de deuxième génération ont été produites à partir de géniteurs de plusieurs des familles de la première génération en vue d'être expérimentée. En effet, nous pourrions analyser leur réponse suite à une inoculation ou par des tests *in vitro*. Même si nous ne disposons pas de beaucoup de familles pour l'étude au cours de la thèse, l'héritabilité du trait de caractère de résistance à la MAB pourrait être envisagée. Dégrement et ses collaborateurs (2010) ont montré une héritabilité de la résistance à l'herpès virus sur les juvéniles des huîtres *C. gigas* de 6<sup>ème</sup> génération. Ceci montre que nous ne sommes qu'au début d'une longue étude.

### **Effet du site d'élevage sur les phénotypes de croissance et du développement de la MAB des familles de palourdes.**

D'une part, les études menées sur trois sites de cultures distincts ont montré que l'environnement avait un impact sur la croissance des animaux pour chacune des familles. En effet, la croissance de toutes les familles cultivées dans l'étang de l'île Tudy a été la plus élevée par rapport aux deux autres sites. Plusieurs paramètres environnementaux peuvent être mis en cause tels que l'apport nutritif, la température ou la présence du *V. tapetis*. Seule la température a été mesurée en 2009 sur les trois sites, laquelle s'est avérée

plus élevée sur le site de l'île Tudy. Cependant, des échantillons de sédiments des trois sites ont été prélevés et pourront être étudiés afin de mesurer la charge bactérienne lorsque que le test de quantification du *V. tapetis* sera mis au point. Le projet du Genoscope permet d'annoter le génome complet de *V. tapetis*. Ainsi des séquences d'ADN spécifiques de *V. tapetis* ont été identifiées et un test par qPCR est en cours de réalisation.

D'autre part, une différence de la prévalence sur les trois sites a été observée pendant le suivi de 18 mois. L'île Tudy est une fois de plus valorisée par sa prévalence plus faible mais également par des stades de maladie moins avancés que ceux des autres sites. **Le site de l'île Tudy semble être privilégié pour la culture de la palourde en Finistère.**

### **Identification de gènes impliqués dans le processus de défense contre le *V. tapetis*.**

Deux approches moléculaires sur la réponse de la palourde japonaise face au *V. tapetis* ont été menées au cours de la thèse. La première approche traitait des gènes impliqués dans l'immunité suite à un contact *in vitro* entre les hémocytes et *V. tapetis* (annexe Brulle et al., in prep.). Cette étude a permis de constater que des gènes de l'immunité ainsi que l'actine sont différentiellement exprimés après un contact avec le *V. tapetis*. La seconde approche moléculaire, exposée dans la thèse, a été réalisée sur le manteau, organe cible de *V. tapetis*. Elle concernait les gènes différentiellement exprimés d'individus inoculés et non inoculés par la bactérie après 1 jour d'incubation *in vivo*. L'expression des six gènes sélectionnés pour leur fonction dans la défense immunitaire et dans les mécanismes de biominéralisation a montré des différences pouvant être reliées au développement de la MAB. En particulier, les gènes de la carbonic anhydrase like (CA-like) et de l'inhibiteur de la serine protéase sont exprimés dans les cellules du manteau mais pas dans les hémocytes. L'expression de la CA-like pourrait être un indicateur des stades de réparation de la MAB. Des analyses de l'expression de ces gènes devraient être effectuées sur les familles de première génération.

Par ailleurs, en collaboration avec l'équipe de Bassem Allam (Université de Stony Brook, USA), des expressions de gènes du manteau, de l'hémolymphe

et des fluides extrapalléaux entre des individus malades et asymptomatiques de la famille M2F2 (une des familles les plus sensibles à la MAB) et des individus asymptomatiques de la famille M3F3 (la famille moins sensible à la MAB) seront comparées par des techniques sur puces à oligonucléotides.

En conclusion, le schéma global (Fig. 81) illustre les avancées, obtenues au cours de la thèse, sur les processus de la MAB au niveau individuel et sur les familles de palourdes japonaises d'écloserie.

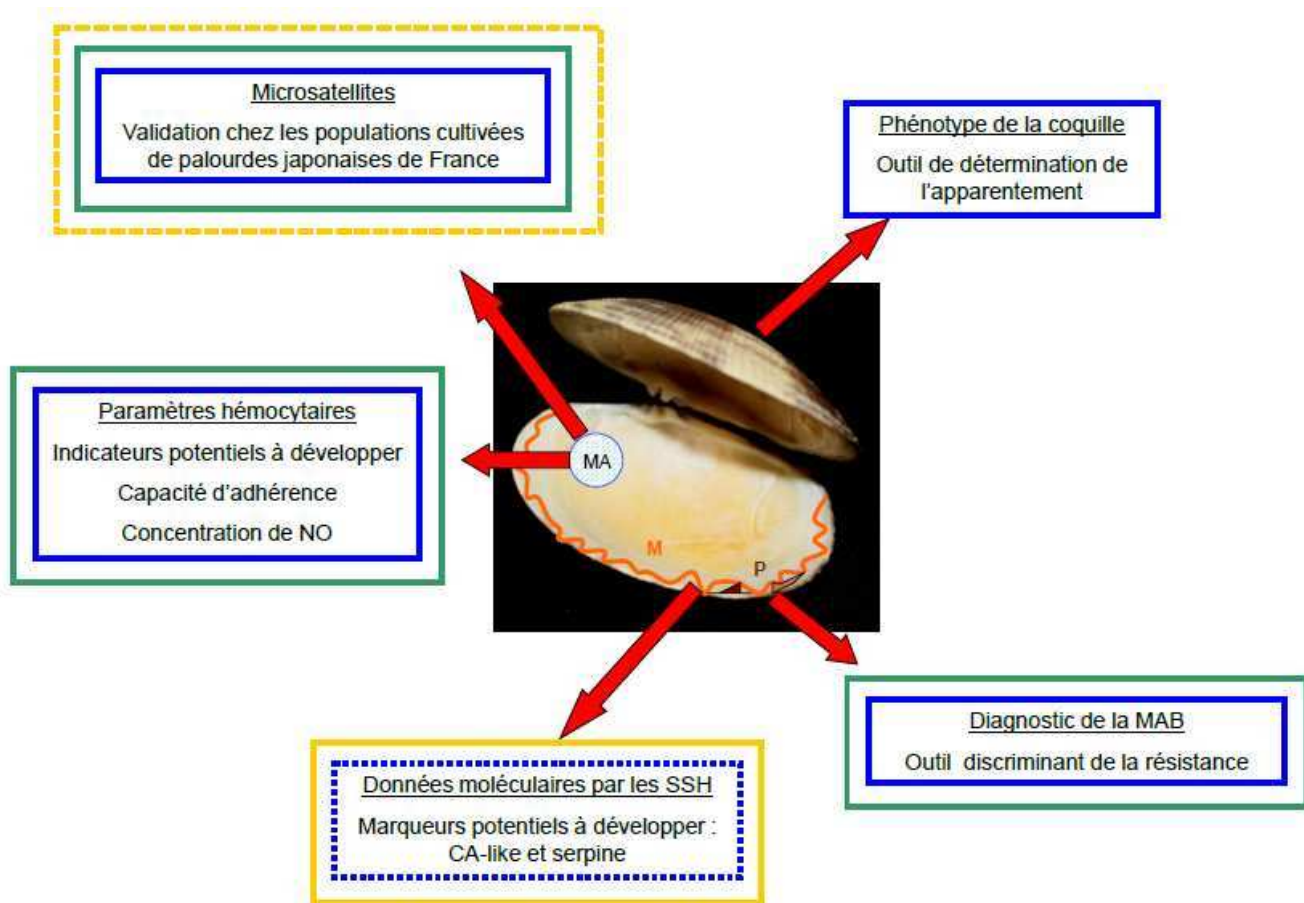


Fig. 48: Schéma global des données obtenues (traits pleins) sur les familles (en bleu), sur les géniteurs (en vert) et sur les populations naturelles (en orange). Les paramètres seront à développer (traits en pointillés). MA = muscle adducteur, M = manteau et P = périostracum.



## Références bibliographiques

- Alcivar-Warren, A., Overstreet, R.M., Dhar, A.K., Astrofsky, K., Carr, W.H., Sweeney, J., Lotz, J.M., 1997. Genetic Susceptibility of Cultured Shrimp (*Penaeus vannamei*) to Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus and *Baculovirus penaei* : Possible Relationship with Growth Status and Metabolic Gene Expression. *Journal of Invertebrate Pathology* 70, 190-197.
- Allam B., Paillard C., 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis Aquat Organ* 33, 123-128.
- Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 2000a. Alterations in Hemolymph and Extrapallial Fluid Parameters in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, Challenged with the Pathogen *Vibrio tapetis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 76, 63-69.
- Allam B, P.C., Howard A, Le Pennec M., 2000b. Isolation of the pathogen *Vibrio tapetis* and defense parameters in Brown ring diseased Manila clams *Ruditapes philippinarum* cultivated in England. *Dis Aquat Organ* 41, 105-113.
- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A., Ford, S.E., 2001. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 365-375.
- Allam B., Paillard C., S., F., 2002a. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis Aquat Organ* 48, 221-231.
- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A., Ford, S.E., 2002b. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish and Shellfish Immunology* 13, 141-158.
- Allam, B., Ford, S.E., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following in vitro challenge. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 374-383.
- An, H., Kim, E., Park, J., 2009. Isolation and characterization of microsatellite markers for the clam *Ruditapes philippinarum*; and cross-species amplification with the clam *Ruditapes variegata*. *Conservation Genetics* 10, 1821-1823.
- Auffret M., 1988. Bivalve hemocytes morphomogy in disease processes in marine bivalve molluscs. *Am. Fish. Soc. Special Pub.* 18, 169-177.
- Borrego J., Luquet A., Castro D., Santamaria J.A., Martinez-Mansanares, 1996. Virulence factor of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Aquat. Living Resour* 9, 125-136.

- Bowers MD., Stamp NE., 1993. Effect of plant age, genotype, and herbivory on *Plantago* performance and chemistry. *Ecology* 74, 1778-1791.
- Brulle F., Jeffroy F., Madec S., Nicolas J.L. and Paillard C., 2012. Transcriptomic analysis of *Ruditapes philippinarum* hemocytes reveals specific gene-expression variations after *in vitro* *Vibrio tapetis* challenge *Developmental and Comparative Immunology*, 38,368-376.
- Butt, D., Raftos, D., 2008. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Developmental and Comparative Immunology* 32, 299-306.
- Calvez I., 2003. Approche de la variabilité spatiale d'une population de palourdes *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), aux stades larvaires et post-larvaires. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp.100.
- Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L., 2010. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. *Fish and Shellfish Immunology* 28, 622-631.
- Cawthorn R J, 2011. Diseases of American lobsters (*Homarus americanus*): A review. *Journal of Invertebrate Pathology* 106, 71-78.
- Comps M., Bomnami J.R., Vago C., Campillo A., 1976. Une virose de l'huître portugaise *Crassostrea angulata*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1991-1993.
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198, 116-126.
- Choquet G, Soudant P, Lambert C, Nicolas J-L, Paillard C, 2003. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Organ* 57, 109-116.
- Cochennec-Laureau N., Auffret M., Renault T., Langlade A., 2003. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oyster, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 83, 23-30.
- Cochennec-Laureau N., Baud, J.P., Pepin J.F., Benabdelmouna A., P., S., Lupo C., Garcia, C., Arzul, I., Boudry P., Huvet A., Pernet F., Bachere E., Petton B., Bedier E., M., G., Stanisière J.Y., Degremont L., 2011. Les surmortalités des naissains d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*: acquis des recherches en 2010. IFREMER RST/LER/11.07.



- Culloty, S.C., Cronin, M.A., Mulcahy, M.F., 2001. An investigation into the relative resistance of Irish flat oysters *Ostrea edulis* L. to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture* 199, 229-244.
- Culloty, S.C., Cronin, M.A., Mulcahy, M.F., 2004. Potential resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture* 237, 41-58.
- da Silva P M., Comesana P., Fuentes J., Villalba A., 2008. Variability of haemocyte and haemolymph parameters in European flat oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins and relation with infection by the protozoan *Bonamia ostreae*. *Fish and Shellfish Immunology* 24, 551-563.
- Dang C., Gonzalez P., Mesmer-Dudons N., Bonami J-R., Caill-Milly N, de Montaudouin X., 2009. Virus-like particles associated with brown muscle disease in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Arcachon Bay (France). *Journal of Fish Diseases* 32, 577-584.
- Dang, C., Lambert, C., Soudant, P., Delamare-Deboutteville, J.r., Zhang, M.M., Chan, J., Green, T.J., Le Goic, N., Barnes, A.C., 2011. Immune parameters of QX-resistant and wild caught *Saccostrea glomerata* hemocytes in relation to *Marteilia sydneyi* infection. *Fish and Shellfish Immunology*.
- Davis, C.V., Barber, B.J., 1999. Growth and survival of selected lines of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) affected by juvenile oyster disease. *Aquaculture* 178, 253-271.
- De Decker S., 2010. Approches multifactorielles pour l'étude d'interactions entre l'huître creuse *Crassostrea gigas* et deux *Vibrio* pathogènes, *V. splendidus* et *V. aestuarianus*: épidémiologie, variabilité de la sensibilité de l'hôte et pathogénèse. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle, pp388.
- Dégremont L., Soletchnik P., Boudry P., 2010. Summer mortality of selected juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas* under laboratory conditions and in comparison in fields performance. *Journal of Shellfish Research* 24, 847-856.
- Delaporte M., Soudant P., Moal J., Lambert C., Quéré C., Miner P., Choquet G., Paillard C., Samain J.F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Biology* 206, 3053-3064.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S.p., Samain, J.-F., 2006. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* 254, 571-582.

- Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K.-S., Soudant, P., 2009. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. *Aquaculture* 297, 10-24.
- Drake JW., Charlesworth B., Charlesworth D., Crow JF., 1998. Rates of spontaneous mutation. *genetics* 148, 1667-1686.
- Drummond, L.C., Balboa, S., Beaz, R., Mulcahy, M.i.F., Barja, J.L., Culloty, S.C., Romalde, J.s.L., 2007. The susceptibility of Irish-grown and Galician-grown Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, to *Vibrio tapetis* and Brown Ring Disease. *Journal of Invertebrate Pathology* 95, 1-8.
- Drummond, L., Mulcahy, M., Culloty, S., 2006. The reproductive biology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, from the North-West of Ireland. *Aquaculture* 254, 326-340.
- Duplat, D., Puisségur, M., Bédouet, L., Rousseau, M., Boulzaguet, H., Milet, C., Sellos, D., Van Wormhoudt, A., Lopez, E., 2006. Identification of calconectin, a calcium-binding protein specifically expressed by the mantle of *Pinctada margaritifera*. *FEBS LETTERS* 580, 2435-2441.
- Evans B., White RW., Elliott NG., 2000. Characterization of microsatellite loci in the Australian blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach). *Mol Ecol* 9, 1183-1184.
- Fagotti A., Di Rosal I., Simoncelli F, Pipet R K. , Panara F., Pascolini R., 1996. The effects of copper on actin and fibronectin organization in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 20, 383-391.
- Fang FC., 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* 2, 820-832.
- Flassch, J.-P., 1988. La palourde. Dossier d'élevage. Ifremer <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1757/>.
- Flassch JP., Le Borgne Y., 1992. Introduction in Europe from 1972 to 1980 of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) on effects aquaculture production and natural settlement. *ICES Marine Symposium, Conference Proceedings* 194, 92-96.
- Flye Sainte-Marie J., 2007. Approche écophysiological de la Maladie de l'Anneau Brun chez la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*: expérimentations et modélisation. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest pp.144.
- Flye-Sainte-Marie J. , Paillard C., Jean F., 2007a. Impact of Brown Ring Disease clam on the energy budget of the Manila *Ruditapes*

*philippinarum* Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 349, 378-389.

Flye-Sainte-Marie, J., Jean, F., Paillard, C., Ford, S., Powell, E., Hofmann, E., Klinck, J., 2007b. Ecophysiological dynamic model of individual growth of *Ruditapes philippinarum*. Aquaculture 266, 130-143.

Flye-Sainte-Marie, J., Soudant, P., Lambert, C., Le Goïc, N., Goncalvez, M., Travers, M.-A., Paillard, C., Jean, F., 2009a. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 377, 1-11.

Flye-Sainte-Marie, J., Jean, F., Paillard, C., Kooijman, S.A.L.M., 2009b. A quantitative estimation of the energetic cost of brown ring disease in the Manila clam using Dynamic Energy Budget theory. Journal of Sea Research 62, 114-123.

Ford S.E., 1986. Comparison of hemolymph proteins from resistant and susceptible oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). Journal of Invertebrate Pathology 47, 283-294.

Ford, S.E., Kanaley, S.A., Littlewood, D.T.J., 1993. Cellular Responses of Oysters Infected with *Haplosporidium nelsoni*: Changes in Circulating and Tissue-Infiltrating Hemocytes. Journal of Invertebrate Pathology 61, 49-57.

Ford, S.E., Paillard, C., 2007. Repeated sampling of individual bivalve mollusks I: Intraindividual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Fish and Shellfish Immunology 23, 280-291.

Gagnaire B., Frouin H., Moreau K., Thomas-Guyon H., Renault T., 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Fish and Shellfish Immunology 20, 536-547.

Gay M., Renault, T., Pons A.M., Le Roux F., 2004. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*. Taxonomy and host alterations. Dis Aquat Organ 62, 65-74.

Gestal C., Figueras A., Novoa B., 2007. Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: Identification of new antimicrobial peptides. Gene 406, 134-143.

Gouletquer, P., Heral, M., Deslous-Paoli, J.M., Prou, J., Garnier, J., Razet, D., Boromthananat, W., 1989. Ecophysiologie et bilan énergétique de la palourde japonaise d'élevage *Ruditapes philippinarum*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 132, 85-108.

- Haberkorn H., 2005. Description des paramètres de croissance, de cytotoxicité et des caractéristiques sérologiques et génétiques d'une souche de *Vibrio sp* thermotolérante. Rapport de Master 2, Université de Bretagne Occidentale, Quimper.
- Han, K., Lincoln, D.E., 1994. The Evolution of Carbon Allocation to Plant Secondary Metabolites: A Genetic Analysis of Cost in *Diplacus aurantiacus*. *Evolution* 48, 1550-1563.
- Haskin H H., Ford S E., 1979. Development of resistance to *Minshinia nelsoni* (MSX) mortality in laboratory-reared and native oyster stocks in Delaware Bay. *Marine fisheries review*, 54-63.
- Hégaret H., Wikfors G. H., 2005a. Time-dependent changes in hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, and northern bay scallops, *Argopecten irradians irradians*, exposed to a cultured strain of *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 4, 187-199.
- Hégaret H., Wikfors G. H., 2005b. Effects of natural and field-simulated blooms of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* upon hemocytes of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, from two different populations. *Harmful Algae* 4, 201-209.
- Helm MM., M., P., 1990. Tapes philippinarum: biologia e sperimentazione. Ente di sviluppo agricolo veneto, Ch hatchery, breeding and rearing in *Tapes philipinarum* species, pp117-140.
- Herbinger CM., O'Reilly PT., Doyle RW., Wright JM., O'Flynn F., 1999. Early growth performance of Atlantic salmon full-sib reared families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. *Aquaculture* 173, 105-116.
- Hurtado, M.A., da Silva, M.P., Le Goic, N., Palacios, E., Soudant, P., Effect of acclimatization on hemocyte functional characteristics of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*). *Fish and Shellfish Immunology*.
- Huvet A., Jeffroy F., Fabioux C., Daniel J. Y., Quillien V., Van Wormhoudt A., Moal J., Samain J. F., Boudry P., Pouvreau S., 2008. Association among growth, food consumption-related traits and amylase gene polymorphism in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Animal Genetics* 39, 662-665.
- Imamura, M., Yang, J., Yamakawa, M., 2002. cDNA cloning, characterization and gene expression of nitric oxide synthase from the silkworm, *Bombyx mori*. Blackwell Science Ltd, pp. 257-265.
- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.W., 1984. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314, 67-73.

- Jeffroy, F., Paillard, C., 2011. Involvement of nitric oxide in the *in vitro* interaction between Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, hemocytes and the bacterium *Vibrio tapetis*. *Fish and Shellfish Immunology* 31, 1137-1141.
- Jensen AC., Samuelsen BO., Andersen K., Torkildsen L., Lambert C., Choquet G., Paillard C., Bergh O., 2003. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *Vibrio tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Dis Aquat Organ* 54, 25-31.
- Jones G., Sandford C., 1993. Manila clams: Hatchery and Nursery Methods. Innovative Aquaculture Products Ltd.
- Kan H , Kim C , Kwon H , Park J , Roh K , Lee H, Park B , Zhang R , Zhang J , Soderhall K , Ha A, B, L., 2008. Molecular Control of Phenoxidase-induced Melanin Synthesis in an Insect. *Journal of biochemical chemistry* 283, 25316-25323.
- Ker F., 1998. Traitement alternatif à l'utilisation des antibiotiques dans les élevages larvaires de bivalves. Rapport de DESS, Ecole de Biologie Industrielle, Cergy Pontoise, pp.41.
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., Nicolas, J.-L., 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection* 8, 2715-2724.
- Lallias D., Gomez-Raya L., Haley C., Arzul, I., Heurtebise S., Baumont A., P., B., Lapegue, S., 2009a. Combining two test-stages and interval mapping strategy to detect QTLs for resistance to bonamiosis in the european flat oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biotechnology* 11, 570-584.
- Lallias D., Stockdale R., Boudry P., Beaumont AR., Lapegue S., 2009. Characterization of 27 microsatellite loci in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Mol Ecol Resours* 3, 960-963.
- Lambert C., Soudant P., Choquet G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish and Shellfish Immunology* 15, 225-240.
- Lane, E., Birkbeck, T.H., 1999. Toxicity of bacteria towards haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquatic Living Resources* 12, 343-350.
- Laruelle F., 1999. Phénologie et déterminisme de la reproduction chez *Ruditapes decussatus* (L.) et *R. philippinarum* (Adams et Reeve) en Bretagne. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp.230.

- Lawlor, J., Dacanay, A., Hutchings, J., Brown, L., Sperker, S., 2009. Differences in pathogen resistance within and among cultured, conservation-dependent, and endangered populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Environmental Biology of Fishes* 84, 69-78.
- Le Deuff R., Nicolas J-L., Renault T., Cochenec N., 1994. Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of fish Pathologists* 142, 69-72.
- Lightner D.V., Redman R.M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostics methods. *Aquaculture* 164, 201-220.
- Lopez, J.R., Balboa, S., Nunez, S., de la Roca, E., de la Herran, R., Navas, J.I., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., 2011. Characterization of *Vibrio tapetis* strains isolated from diseased cultured Wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau). *Research in Veterinary Science* 90, 189-195.
- Lucas A., 1976. A new type of nursery for rearing bivalve postlarve. Construction equipment et preliminary results. 10th Eur. Symp. Mar. Biol. Ostend. 1, 257-269.
- Lucas A., 1977. Culture of Manila clams (*Venerupis semidecussata* Reeve) from hatchery-reared spat. *Actes de colloque du CNEXO* 4, 317-333.
- Luna-Acosta A., Saulnier D., Pommier M.n., Haffner P., De Decker S., Renault T., Thomas-Guyon H., 2011. First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. In press.
- Maes P., 1992. Pathologie bactérienne chez deux invertébrés marins d'intérêt commercial, *Ruditapes philippinarum* et *Paracentrotus lividus*. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp216.
- Mar Costa, M., Novoa, B., Figueras, A., 2008. Influence of [beta]-glucans on the immune responses of carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Fish and Shellfish Immunology* 24, 498-505.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., Medakovic, D., Gerald, P.S., 2007. Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution, *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press, pp. 209-276.
- Mateo, D.R., Siah, A., Araya, M.T., Berthe, F.C.J., Johnson, G.R., Greenwood, S.J., 2009. Differential in vivo response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: Changes in cell structure, numbers and adherence. *Journal of Invertebrate Pathology* 102, 50-56.

- Matozzo, V., Marin, M.G., Cima, F., Ballarin, L., 2008. First evidence of cell division in circulating haemocytes from the Manila clam *Tapes philippinarum*. *Cell Biology International* 32, 865-868.
- Meistertzheim AL., Tanguy A., Moraga D., Thebault MT., 2007. Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *FEBS journal* 274, 6392-6402.
- Milan, M., Coppe, A., Reinhardt, R., Cancela, L., Leite, R., Saavedra, C., Ciofi, C., Chelazzi, G., Patarnello, T., Bortoluzzi, S., Bargelloni, L., 2011. Transcriptome sequencing and microarray development for the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: genomic tools for environmental monitoring. *BMC GENOMICS* 12, 234.
- Moreira, R., Balseiro, P., Romero, A., Dios, S., Posada, D., Novoa, B., Figueras, A., 2012. Gene expression analysis of clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* following bacterial infection yields molecular insights into pathogen resistance and immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 36, 140-149.
- Morga, B., Arzul, I., Faury, N., Segarra, A.I., Chollet, B., Renault, T., 2011. Molecular responses of *Ostrea edulis* haemocytes to an *in vitro* infection with *Bonamia ostreae*. *Developmental and Comparative Immunology* 35, 323-333.
- Mount, A., Wheeler A. P., Paradkar R. P., Snider D., 2004. Hemocyte-Mediated Shell Mineralization in the Eastern Oyster, *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 297-300.
- Munari, M., Matozzo, V., Marin, M.G., 2011. Combined effects of temperature and salinity on functional responses of haemocytes and survival in air of the clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish and Shellfish Immunology* 30, 1024-1030.
- Munoz P., Meseguer J., Angeles Esteban M., 2006. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 12-19.
- Naciri-Graven, Y., Martin, A.G., Baud, J.P., Renault, T., Gérard, A., 1998. Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 224, 91-107.
- Nell, J.A., Hand, R.E., 2003. Evaluation of the progeny of second-generation Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) breeding lines for resistance to QX disease *Marteilia sydneyi*. *Aquaculture* 228, 27-35.

- Newton K., Peters R., Raftos D., 2004. Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Developmental and Comparative Immunology* 28, 565-569.
- Novas, A., Cao, A., Barcia, R., Ramos-Martinez, J.I., 2004. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36, 390-394.
- Novas, A., Barcia, R., Ramos-Martínez, J.I., 2007. Nitric oxide production by haemocytes from *Mytilus galloprovincialis* shows seasonal variations. *Fish and Shellfish Immunology* 23, 886-891.
- Ordas M. C., Novoa B., Figuera A. , 1999. Phagocytosis inhibition of clam and mussel haemocytes by *Perkinsus atlanticus* secretion products. *Fish and Shellfish Immunology* 9, 491-503.
- Ordas, B., Malvar, R.A., Hill, W.G., 2008. Genetic variation and quantitative trait loci associated with developmental stability and the environmental correlation between traits in maize. *Genetical Research* 90, 385-395.
- Osier, T., Lindroth, R., 2006. Genotype and environment determine allocation to and costs of resistance in quaking aspen. *Oecologia* 148, 293-303.
- Oubella R, Maes P., Paillard C., M., A., 1993. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis Aquat Organ* 15, 193-197.
- Oubella, R., Paillard, C., Maes, P., Auffret, M., 1994. Changes in Hemolymph Parameters in the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) Following Bacterial Challenge. *Journal of Invertebrate Pathology* 64, 33-38.
- Oubella R., Maes P., Allam B., Paillard C., Auffret M., 1996. Selective induction of haemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). *Aquatic Living Resources* 9, 49-57.
- Paillard C., Maes P., 1990. Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum* : pathogénécité d'un *Vibrio* sp. *C.R. Acad. Sci. Paris* 310, 15-20.
- Paillard C., 1992. Etiologie et caractérisation de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'élevage, *Ruditapes philippinarum*. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp 296.
- Paillard, C., Le Pennec, M., 1993. Ultrastructural studies of the mantle and the periostracal lamina in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Tissue and Cell* 25, 183-194.



- Paillard, C., Maes, P., Oubella, R., 1994. Brown ring disease in clams. Annual Review of Fish Diseases 4, 219-240.
- Paillard C., Maes P., 1994. Brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. . Dis. Aquat. Res. 19, 137-146.
- Paillard, C., Maes, P., 1995. The Brown Ring Disease in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*: I. Ultrastructural Alterations of the Periostacal Lamina. Journal of Invertebrate Pathology 65, 91-100.
- Paillard C., 2004. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes: développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. HDR, Université de Bretagne Occidentale, Brest, p177.
- Paillard C., 2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussates*. Aquat. Living. Resour. 17, 467-475.
- Paillard C., Allam B., Oubella R., 2004. Effect of temperature on defense parameters in manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Dis Aquat Organ 59, 249-262.
- Park, K.-I., Choi, K.-S., 2004. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for studying of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*(Mollusca: Bivalvia): I. Quantifying eggs. Aquaculture 241, 667-687.
- Park, K.-I., Paillard, C., Le Chevalier, P., Choi, K.-S., 2006. Report on the occurrence of brown ring disease (BRD) in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, on the west coast of Korea. Aquaculture 255, 610-613.
- Perrigault M., Tanguy A., Allam B., 2009. Identification and expression of differentially expressed genes in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, in response to quahog parasite unknown (QPX). BMC GENOMICS 10.
- Pronnier F., 1996. Le développement larvaire et l'alimentation des larves de bivalves d'écloserie. Thèse pour le diplôme d'état vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaires de Nantes, Nantes, pp.100.
- Quéro J.C., Vayne J.J., 1998. Les fruits de la mer et plantes marines des pêches françaises. Delachaux et Nestlé, Lausanne (Suisse), pp.256.
- Quillet E., Boudry P., Lapeygue S., 2007. Variabilité génétique de la réponse aux organismes pathogènes: un outil pour améliorer la santé des mollusques et poissons d'élevage. INRA Prod. Anim. 20, 239-252.

- Reid H. I. , Soudant P. , Lambert C. , Paillard C., Birkbeck T. H., 2003. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Dis Aquat Org 49, 249-258.
- Renault T., Le Deuff R., Cochenec N., Chollet B., Maffart P., 1995. Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: A comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. Veterinary research 26, 539-543.
- Robert R., Detreil JP., 1990. Elevage de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, dans le bassin d'Arcachon. Bilan des dix dernières années et perspectives de développement. Rapport internes de la direction des ressources vivantes de l'IFREMER.
- Robert R., Trut G., Laborde J.L., 1993. Growth, reproduction and gross biochemical composition of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in the Bay of Arcachon. France. Marine Biology 116, 291-299.
- Samain, J., McCombie, H., 2007. Versailles. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea virginica*. The Morest project.
- Saulnier D., Haffner P., Goarant C., Levy P., Ansquer D., 2000. Experimental infection model for shrimp vibriosis studies: a review. Aquaculture 191, 133-144.
- Sauvage C., Boudry P., Koning, D., Haley C., S., H., Lapegue S., 2010. QTLs for resistance to summer mortality and OsHV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Animal Genetics 41, 390-399.
- Simonian, M., Nair, S.V., Nell, J.A., Raftos, D.A., 2009. Proteomic clues to the identification of QX disease-resistance biomarkers in selectively bred Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. Journal of Proteomics 73, 209-217.
- Selvamani MJ., Degnan SM., Paetkau D., Degnan DM., 2000. Highly polymorphic microsatellite loci in the heron reef population of the tropical abalone *Haliotis asinina*. Mol Ecol 8, 1184-1186.
- Snieszko, S.F., 1973. Recent advances in scientific knowledge and developments pertaining to diseases of fishes. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 17, 291-314.
- Soderhall K., Cerenius L., Johansson M.W., 1994. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence. Ann N Y Acad Sci 712, 155-161.
- Soderhall, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Current Opinion in Immunology 10, 23-28.

- Solidoro C., Pastres R., Melaku Kanu D., Pellizzato M., Rossi R., 2000. Modelling the growth of *Tapes philippinarum* in Northern Adriatic lagoons. Mar. Ecol. Prog. Ser. 199.
- Song L., Xu W., Li C., Li H., Wu L., Xiang J., Guo X., 2006. Development of Expressed Sequence Tags from the Bay Scallop, *Argopecten irradians irradians*. Marine Biotechnology 8, 161-169.
- Soudant, P., Paillard, C., Choquet, G., Lambert, C., Reid, H.I., Marhic, A., Donaghy, L., Birkbeck, T.H., 2004. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis (=Tapes, =Ruditapes) philippinarum*. Aquaculture 229, 401-418.
- Sugumar G., Natai T., Hirata Y., Matsubara D., Muroga K., 1998. *Vibrio splendidus* biovar I1 as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. Dis Aquat Organ 33.
- Tafalla C., Gomez-Leon J., Novoa B., Figueras A., 2003. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. Developmental and Comparative Immunology 27, 197-205.
- Tanguy A., Guo X., Ford S E., 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. Gene 338, 121-131.
- Taris, N., Sauvage, C., Batista, F.M., Baron, S., Ernande, B., Haffray, P., Boudry, P., 2006. Conséquences génétiques de la production de larves d'huîtres en éclosion : étude des processus de dérive et de sélection. Les Actes du BRG.
- Toreilles J., 2001. Nitric Oxide: one of the more conserved and widespread signaling molecules. Front Biosciences 1, 1161-1172.
- Travers M-A., Le Goic N., Huchette S., Koken M., Paillard C., 2008. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. Fish and Shellfish Immunology 25, 800-808.
- Travers M-A., Meistertzheim AL., Cardinaud M., Friedman C., Huchette S., Moraga D., Paillard C., 2010. Gene expression patterns of abalone, *Haliotis tuberculata*, during successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi*. J invertebr pathol 105, 289-297.
- Trinkler, N., Siquin, G., Querne, J., Paillard, C., 2010. Resistance to Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: A study of selected stocks showing a recovery process by shell repair. Journal of Invertebrate Pathology 104, 8-16.

- Trinkler N., 2009. La guérison coquillière: un mécanisme de défense de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, face au *Vibrio tapetis* dans le cadre de la maladie de l'anneau brun. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp 287.
- Trinkler N., Bardeau JF., Marin F., Labonne M., Jolivet A., Crassous P., Paillard C., 2011. Mineral phase in shell repair of Manila clam *Venerupis philippinarum* affected by brown ring disease. DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS 93, 149-162.
- Vandeputte M., Prunet P., 2002. Génétique et adaptation chez les poissons: domestication, résistance aux stress et adaptation aux conditions du milieu. INRA Prod. Anim. 15, 365-371.
- Venier P., Varotto L., Rosani U., Millino C., Celegato B., Bernante, F., Lanfranchi, G., Novoa B., Roch P., Figueras A., Pallavicini A., 2011. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. BMC GENOMICS 12, 69.
- Villamil, L., Gómez-León, J., Gómez-Chiarri, M., 2007. Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. Developmental and Comparative Immunology 31, 968-977.
- Waetcher M., Le Roux F., Nicolas J-L., Marissal E., Berthe F., 2002. Characterization of the pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. Comptes rendu de l'Académie des sciences série III Biologie 325, 231-238.
- Williams, J., Auge, H., Maron, J., 2008. Different gardens, different results: native and introduced populations exhibit contrasting phenotypes across common gardens. Oecologia 157, 239-248.
- Yap WG., 1977. Population biology of the japanese little neck clam *Tapes philippinarum* in Kenehoe Bay, Hawaiian island. Pacific Science 31, 223-244.
- Yasuda, N., Nagai, S., Yamaguchi, S., Lian, C.L., Hamaguchi, M., 2007. Development of microsatellite markers for the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Molecular Ecology Notes 7, 43-45.
- Yu, Z., Guo, X., 2006. Identification and mapping of disease-resistance QTLs in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. Aquaculture 254, 160-170.
- Yu, H., He, Y., Wang, X., Zhang, Q., Bao, Z., Guo, X., 2011. Polymorphism in a serine protease inhibitor gene and its association with disease resistance in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin). Fish and Shellfish Immunology 30, 757-762.

- Zapata, M., Tanguy, A., David, E., Moraga, D., Riquelme, C., 2009. Transcriptomic response of *Argopecten purpuratus* post-larvae to copper exposure under experimental conditions. *Gene* 442, 37-46.
- Zhang LS., Xiang LH., 2005. A preliminary study on the inheritance of microsatellite in two selective breeding families of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Yi chuang* 6, 919-924.
- Zhao J., Li C, Chen A , Li L , Su X, Li T., 2010. Molecular Characterization of a Novel Big Defensin from Clam *Venerupis philippinarum*. *PLoS ONE* 5.

# **Annexes**

## Analyses génétiques des los R et S au long de l'étude.

1- R et S de Landéda (janvier 2008) :

Fréquences alléliques par loci pour les lots R et S.

<i>Locus</i>																	
<i>A16</i>			<i>A24</i>			<i>A54</i>			<i>A55</i>			<i>A62</i>			<i>A64</i>		
N° all	R	S	N° all	R	S	N° all	R	S	N° all	R	S	N° all	R	S	N° all	R	S
<b>163</b>	38,0		<b>161</b>	15,2		<b>241</b>	2,1	4,0	<b>187</b>	11,3		<b>218</b>	2,4	0,0	<b>114</b>	4,4	17,0
<b>165</b>	6,5		<b>163</b>	2,2		<b>243</b>	1,1	0,0	<b>192</b>	9,0		<b>220</b>	0,0	16,7	<b>122</b>	14,7	
<b>169</b>	13,0	50,0	<b>167</b>	30,4		<b>245</b>	21,3	42,0	<b>193</b>	25,0		<b>222</b>	6,1	8,3	<b>124</b>	4,4	
<b>171</b>	8,7		<b>173</b>	8,7		<b>247</b>	38,7	50,0	<b>194</b>	11,0		<b>224</b>	0,0	16,7	<b>127</b>	10,3	
<b>173</b>	29,3	50,0	<b>175</b>	15,2		<b>249</b>	23,4	0,0	<b>196</b>	3,2		<b>226</b>	29,3	16,7	<b>130</b>	42,7	50,0
<b>175</b>	3,3		<b>177</b>	28,3		<b>251</b>	5,1	4,0	<b>198</b>	1,8		<b>228</b>	34,1	16,7	<b>142</b>	0,0	33,0
<b>177</b>	1,1					<b>253</b>	2,1	0,0	<b>199</b>	20,1	100,0	<b>230</b>	6,1	8,3	<b>144</b>	23,5	
						<b>255</b>	5,3	0,0	<b>201</b>	7,3		<b>232</b>	19,5	16,7			
						<b>259</b>	1,1	0,0				<b>240</b>	1,2				
												<b>242</b>	1,2				

Hétérozygotie et indice de fixation des microsatellites sur les lots R et S. He : hétérozygotie attendue, Ho : hétérozygotie observée, Fis : indice de fixation.  $p < 0.05$  : différence significative.

<i>Locus</i>													
<i>Asari16</i>		<i>Asari24</i>		<i>Asari54</i>		<i>Asari55</i>		<i>Asari62</i>		<i>Asari64</i>			
Lot	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	
<b>He</b>	0,739		0,784		0,748		0,697		0,751		0,760		
<b>Ho</b>	0,750		0,560		0,692		0,424		0,841		0,939		
<b>Fis</b>	0,034	-0,333	0,427		0,119	0,520	0,581		-0,081	-0,111	-0,040	-0,412	
<b>p</b>	ns		<0,0001		ns		<0,0001		ns		ns		

2- R et S de Chausey (août 2008) :

Fréquences alléliques par loci pour les lots R (n=50) et S (n=50).

<i>Locus</i>																	
<i>A16</i>			<i>A24</i>			<i>A54</i>			<i>A55</i>			<i>A62</i>			<i>A64</i>		
N° all	R	S	N° all	R	S	N° all	R	S	N° all	R	S	N° all	R	S	N° all	R	S
<b>163</b>	45,7	23,9	<b>161</b>	1,2	0,0	<b>245</b>	24,0	15,9	<b>187</b>	13,3	2,3	<b>218</b>	3,2	0,0	<b>114</b>	0,0	15,8
<b>165</b>	8,6	4,5	<b>167</b>	60,7	59,2	<b>247</b>	37,5	67,0	<b>192</b>	1,0	3,4	<b>222</b>	6,4	3,6	<b>122</b>	23,4	36,9
<b>169</b>	6,4	20,5	<b>171</b>	7,1	7,9	<b>249</b>	38,5	17,1	<b>193</b>	21,4	25,0	<b>224</b>	3,2	4,8	<b>124</b>	8,5	2,6
<b>171</b>	10,6	6,8	<b>173</b>	4,8	7,9				<b>194</b>	3,0	0,0	<b>226</b>	29,8	38,1	<b>127</b>	4,3	0,0
<b>173</b>	24,5	43,2	<b>175</b>	1,2	5,3				<b>196</b>	5,1	12,5	<b>228</b>	26,6	35,7	<b>130</b>	46,8	34,2
<b>175</b>	2,1	1,1	<b>177</b>	25,0	19,7				<b>197</b>	0,0	9,1	<b>230</b>	9,6	11,9	<b>142</b>	0,0	7,9
<b>177</b>	2,1	0,0							<b>198</b>	6,1	0,0	<b>232</b>	12,7	1,2	<b>144</b>	17,0	2,6
									<b>199</b>	32,7	21,6	<b>234</b>	0,0	4,7			
									<b>200</b>	3,1	18,1	<b>242</b>	8,5	0,0			
									<b>201</b>	14,3	3,4						
									<b>204</b>	0,0	2,3						
									<b>208</b>	0,0	2,3						

Hétérozygotie et indice de fixation des microsatellites sur les lots R et S.

<i>Locus</i>													
	<i>A16</i>		<i>A24</i>		<i>A54</i>		<i>A55</i>		<i>A62</i>		<i>A64</i>		
<b>Lot</b>	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	
<b>He</b>	0,707	0,707	0,561	0,595	0,653	0,496	0,801	0,830	0,801	0,707	0,688	0,714	
<b>Ho</b>	0,830	0,750	0,781	0,816	0,458	0,500	0,531	0,750	0,872	0,833	0,851	0,895	
<b>Fis</b>	-0,163	-0,048	-0,390	-0,359	0,308	0,004	0,347	0,108	-0,077	-0,167	-0,227	-0,226	
<b>p</b>	ns	ns	ns	ns	0,0024	ns	0,0007	0,0286	ns	ns	ns	ns	



### 3- R et S de Landéda (avril 2009) :

Fréquences alléliques par loci pour les lots R et S.

<i>Locus</i>																	
<i>A16</i>			<i>A24</i>			<i>A54</i>			<i>A55</i>			<i>A62</i>			<i>A64</i>		
N° all	R	S	N° all	R	S	N° all	R	S	N° all	R	S	N° all	R	S	N° all	R	S
<b>163</b>	41,3	18,8	<b>167</b>	72,2	56,8	<b>241</b>	0,0	6,3	<b>187</b>	11,5	4,3	<b>218</b>	4,0	4,3	<b>113</b>	3,7	12,5
<b>165</b>	5,0	10,4	<b>173</b>	1,4	9,1	<b>245</b>	18,0	22,9	<b>192</b>	1,3	0,0	<b>222</b>	4,0	0,0	<b>114</b>	0,0	2,1
<b>169</b>	15,0	8,3	<b>175</b>	0,0	4,5	<b>247</b>	38,4	45,8	<b>193</b>	41,0	30,4	<b>226</b>	27,6	50,0	<b>122</b>	16,3	22,9
<b>171</b>	17,5	14,6	<b>177</b>	26,4	29,6	<b>249</b>	43,6	22,9	<b>196</b>	9,0	10,9	<b>228</b>	30,3	41,3	<b>124</b>	10,0	14,6
<b>173</b>	18,7	43,8				<b>251</b>	0,0	2,1	<b>199</b>	32,0	36,9	<b>230</b>	10,5	0,0	<b>127</b>	8,8	0,0
<b>175</b>	2,5	4,2							<b>201</b>	1,3	6,5	<b>232</b>	19,7	4,4	<b>130</b>	48,8	47,9
<b>177</b>									<b>204</b>	1,3	6,5	<b>242</b>	3,9	0,0	<b>142</b>	1,2	0,0
									<b>208</b>	2,6	0,0				<b>144</b>	11,2	0,0

Hétérozygotie et indice de fixation des microsatellites sur les lots R et S.

<i>Locus</i>												
	<i>A16</i>		<i>A24</i>		<i>A54</i>		<i>A55</i>		<i>A62</i>		<i>A64</i>	
<b>Lot</b>	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
<b>He</b>	0,748	0,733	0,409	0,580	0,630	0,681	0,706	0,747	0,777	0,576	0,704	0,680
<b>Ho</b>	0,700	0,750	0,568	0,870	0,667	0,750	0,744	0,667	0,921	0,783	0,850	0,917
<b>Fis</b>	0,122	-0,059	-0,360	-0,450	-0,046	-0,142	-0,063	0,321	-0,159	-0,340	-0,195	-0,283
<b>p</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,0004	ns	ns	ns	ns

## Communications scientifiques

### Communications à comité de lecture

**Jeffroy, F.**, Paillard, C., 2011. Involvement of nitric oxide in the *in vitro* interaction between Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, hemocytes and the bacterium *Vibrio tapetis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 1137-1141.

**Jeffroy Fanny**, Paillard Christine. Shell color and shell pattern as a complementary tool of microsatellites for *Ruditapes philippinarum* family identification in field experiments, en révision à *Aquaculture*.

**Jeffroy Fanny**, Brulle Franck and Paillard Christine. Identification of genes that are differentially expressed in *Ruditapes philippinarum* mantle through *Vibrio tapetis* incubation. en revision à *Journal of Invertebrate Pathology*.

Brulle Franck, **Jeffroy Fanny**, Madec Stéphanie, Nicolas Jean-Louis and Paillard Christine. 2012. Transcriptomic analysis of *Ruditapes philippinarum* hemocytes reveals cytoskeleton disruption after *in vitro* *Vibrio tapetis* challenge. *Developmental and Comparative Immunology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2012.03.003>

### Communications orales

**Fanny Jeffroy**, Nelly Le Goïc, Franck Brulle, Jean-François Auvray and Christine Paillard Impact of vibriosis on physiological and immunological parameters of Manila clams : families' susceptibility comparison in two aquaculture sites Physiomar, Québec, Canada, 28 Octobre - 3 Novembre 2010.

Franck Brulle **Fanny Jeffroy**, Stéphanie Madec, Jean-Louis Nicolas and Christine Paillard. Generation of new EST sequences from *Ruditapes philippinarum* hemocytes. A study allowing identification of genes involved in various physiological functions Physiomar, Québec, Canada, 28 Octobre - 3 Novembre 2010.

**Fanny Jeffroy**, Franck Brulle and Christine Paillard Gene expressions through the Brown Ring Disease on hemocytes and on mantle of manila clams, *Ruditapes philippinarum*. NSA, Baltimore, USA, 27-31 Mars 2011.

Communications affichées

**Jeffroy Fanny** et Paillard Christine. La palourde qui résiste...  
Doctoriales2009 Saint Malo, France, 1-4 décembre 2009.

**Jeffroy Fanny** and Paillard Christine. Complementarities between microsatellites and two phenotypes, shell color and ornamentation, to identify families of *Ruditapes philippinarum*: a tool for research survey and aquaculture management. NSA, Baltimore, USA, 27-31 Mars 2011.



## Résumé

La culture de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, en Bretagne s'est estompée à partir des années 80 après l'apparition de la vibriose appelée Maladie de l'Anneau Brun (MAB). Cette maladie est causée par la présence de la bactérie *Vibrio tapetis* qui provoque un dépôt caractéristique de conchyoline sur le bord interne des valves des palourdes. Les animaux parviennent à réparer la coquille au niveau des dépôts de conchyoline par un phénomène de recalcification. Des géniteurs et des familles de palourdes ont été étudiés afin de différencier les individus les moins sensibles à cette maladie. Ainsi, ces études ont permis de discriminer deux familles montrant des caractères de défense immunitaires différents au niveau des paramètres hématocytaires et au niveau du développement de la MAB. De plus, il a été démontré que le *V. tapetis* induit une production de l'oxyde nitrique *in vitro* dans les hémocytes de la palourde japonaise. Enfin, les approches moléculaires ont permis de mettre en évidence l'expression spécifique de deux transcrits de gènes (carbonique anhydrase like et inhibiteur de sérine protéases (serpine)) dans le manteau en lien avec le développement de la MAB.

Mots clés : Palourde, *Ruditapes philippinarum*, maladie de l'anneau brun, *Vibrio tapetis*, hémocytes, immunité, sélection, résistance.

## Abstract

The culture of Manila clams in Brittany has faded from the 80 years after the onset of the disease called vibriosis of the Brown Ring (MAB). This disease is caused by the presence of the bacterium *Vibrio tapetis* causes a characteristic conchiolin deposit on the inner edge of the valves of the clams. The animals are able to repair the shell at the conchiolin deposits by a phenomenon of recalcification. Broodstock was selected according to their stage of disease development after inoculation of bacteria into the pallial cavity or following their physiological response in the hemolymph. Families of clams were produced and comparisons of the response to the disease were made between families in order to differentiate with the least susceptible individuals to this disease. Thus, these studies have to distinguish two families showing different characteristics of the immune level and hemocyte parameters in the development of the MAB. A relationship between families and ornamentation/color of the shell has been detected and enabled, in the thesis, to differentiate families in addition to the microsatellite tool. Moreover, it was shown that the *V. tapetis* induces production of nitric oxide *in vitro* in hemocytes of Manila clams. Moreover, when NO production is inhibited, the number of adherent cells decreases. Finally, molecular approaches have helped to highlight the specific expression of two gene transcripts (carbonic anhydrase like and serpin) in the mantle related to the development of the MAB.

Key words : Clam, *Ruditapes philippinarum*, Brown Ring Disease, *Vibrio tapetis*, hemocytes, immunity, selection, resistance.

