



HAL
open science

Approche mécanistique de la réponse de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, exposée à la bactérie *Vibrio tapetis*: influence de la température et du régime algal

Gaëlle Richard

► **To cite this version:**

Gaëlle Richard. Approche mécanistique de la réponse de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, exposée à la bactérie *Vibrio tapetis*: influence de la température et du régime algal. Biologie animale. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2015. Français. NNT : 2015BRES0103 . tel-02272897

HAL Id: tel-02272897

<https://theses.hal.science/tel-02272897>

Submitted on 28 Aug 2019

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.



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 des Sciences de la Mer

présentée par

Gaëlle Richard

Préparée à l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), au Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR, UMR 6539)

Approche mécanistique de
la réponse de la palourde
japonaise, *Ruditapes
philippinarum*, exposée à la
bactérie *Vibrio tapetis* :
influence de la température
et du régime algal

Soutenance prévue le 17 décembre 2015

devant le jury composé de :

Réjean TREMBLAY

Professeur, Institut des Sciences de la Mer de Rimouski / *Rapporteur*

Ingrid ARNAUDIN

Maitre de Conférences, Université de la Rochelle / *Rapporteur*

Marie-Agnès TRAVERS

Chercheur IFREMER, La Tremblade / *Examineur*

Fabrice PERNET

Chercheur IFREMER, Brest / *Examineur*

Christine PAILLARD

Directrice de recherche, CNRS, Brest / *Co-directrice de thèse*

Fabienne GUERARD

Professeur, UBO, Brest / *Directrice de thèse*

Sommaire

Introduction.....	1
Contexte général	2
Problématique et objectifs de la thèse	6
Etat de l'art.....	9
1. La palourde japonaise, <i>Ruditapes philippinarum</i>	10
1.1. Systématique et principales caractéristiques	10
1.2. Biologie de la palourde japonaise.....	11
2. Mécanismes de la réponse des invertébrés marins exposés à des stressseurs environnementaux.....	19
2.1. Qu'est-ce que le stress ?.....	19
2.2. Retour sur les réponses générales à des stressseurs chez les vertébrés et les invertébrés	20
2.3. La réponse immunitaire chez les invertébrés marins.....	25
2.4. Modulation de la réponse immunitaire par l'environnement.....	50
2.5. Le métabolisme énergétique chez les invertébrés marins.....	58
3. Un modèle d'interaction hôte-pathogène-environnement : la maladie de l'anneau brun (MAB)	64
3.1. La MAB : signes cliniques	64
3.2. Caractérisation du pathogène associé à la MAB: <i>Vibrio tapetis</i>	67
3.3. Les différents modes d'infection de <i>R. philippinarum</i> par <i>V. tapetis</i> en milieu contrôlé	70
3.4. Réponses de <i>R. philippinarum</i> à l'infection par <i>V. tapetis</i>	71
3.5. Influence de l'environnement sur l'interaction <i>R. philippinarum</i> / <i>V. tapetis</i>	76
Matériel et méthodes	78
1. Matériel biologique et conditionnement.....	79
1.1. Expérimentation préliminaire : existe-t-il des variations endogènes des activités SOD, CAT et PO chez <i>Ruditapes philippinarum</i> ?	79
1.2. Expérimentation 1 : effet de la température sur l'interaction <i>R. philippinarum</i> – <i>V. tapetis</i>	80
1.3. Expérimentation 2 : effet du régime algal et de la maturité sexuelle sur l'interaction <i>R. philippinarum</i> – <i>V. tapetis</i>	81
2. Design expérimentaux et plans d'échantillonnage.....	85
2.1. Expérimentation préliminaire.....	85
2.2. Expérimentation 1.....	86
2.3. Expérimentation 2 : étude individuelle	87
2.4. Expérimentation 2 : sous-échantillonnage et étude par pool.....	88

3.	Prélèvements.....	90
3.1.	Prélèvement des fluides.....	90
3.2.	Prélèvement des organes	91
4.	Indices de condition	92
5.	Cytométrie en flux.....	92
5.1.	Concentration, viabilité, taille et complexité des hémocytes.....	92
5.2.	Taux de phagocytose.....	93
5.3.	Production d'ERO	93
6.	Histologie : sexage et détermination des stades de maturité	94
6.1.	Préparation des échantillons	94
6.2.	Colorations et montage	95
6.3.	Analyse qualitative au microscope optique.....	96
7.	Diagnostic de la maladie de l'anneau brun	97
7.1.	Qualitativement : <i>via</i> l'observation des signes cliniques et l'utilisation d'une clé de détermination.....	97
7.2.	Quantitativement : <i>via</i> l'analyse d'images	98
7.3.	Prévalence et intensité de la MAB.....	99
8.	Dosages biochimiques.....	99
8.1.	Protéines	99
8.2.	Dosages enzymatiques.....	101
8.3.	Lipides	112
8.4.	Glucides.....	114
9.	Quantification de <i>V. tapetis</i> dans les fluides extrapalléaux.....	114
10.	Analyses statistiques	115
10.1.	Analyse de coordonnées principales de matrices de voisinage et partition de la variance.....	115
10.2.	Analyses de la variance : plan d'expérience en parcelles divisées	117
10.3.	Analyse de variance multivariée par permutations	117
10.4.	Modélisation Linéaire Mixte	118
10.5.	Modélisation Linéaire Généralisée Mixte : régression logistique.....	119
10.6.	Modélisation linéaire généralisée: régression logistique multinomiale.....	121

1 ^{ère} partie.....	
Effet de la température sur le développement de la maladie de l’anneau brun : étude de la réponse immunitaire de <i>Ruditapes philippinarum</i> exposée à deux souches de <i>Vibrio tapetis</i>	123
1. Expérimentation préliminaire: existe-t-il un rythme endogène des activités antioxydantes et PO chez <i>R. philippinarum</i>	124
1.1. Introduction et problématique de l’étude.....	124
1.2. Résultats et discussion	125
2. Effet de la température sur le développement de la maladie de l’anneau brun : étude de la réponse immunitaire de <i>Ruditapes philippinarum</i> exposée à deux souches de <i>V. tapetis</i>	129
2.1. Introduction	129
2.2. Article 1: Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam <i>Venerupis philippinarum</i> challenged with <i>Vibrio tapetis</i> – part II: Combined effect of temperature and two <i>Vibrio tapetis</i> strains	131
2.3 Conclusions de l’expérimentation 1.....	141
2 ^{ème} partie.....	
Effet du régime algal et du statut de reproduction de <i>Ruditapes philippinarum</i> sur le développement de la maladie de l’anneau brun	142
1. Introduction.....	143
2. Article 2	145
“Brown Ring Disease in Manila clam, <i>Ruditapes philippinarum</i> : effect of algal diet quality and reproduction status”	145
3. Conclusions de l’expérimentation 2 – étude individuelle.....	180
3 ^{ème} partie.....	
Réponses métaboliques de <i>Ruditapes philippinarum</i> exposée à <i>Vibrio tapetis</i> en relation avec le régime algal	182
1. Introduction.....	183
2. Article 3	184
“Metabolic responses of clam <i>Ruditapes philippinarum</i> exposed to its pathogen <i>Vibrio tapetis</i> in relation to diet”	184
3. Conclusions de l’expérimentation 2 – étude par pools	218

Discussion générale	220
1. La maladie de l'anneau brun : influence de quelques facteurs internes.....	222
1.1. La virulence de <i>Vibrio tapetis</i> : comparaison entre deux souches	222
1.2. La maladie de l'anneau brun : une histoire de compromis énergétiques chez l'hôte ?.....	224
2. La maladie de l'anneau brun : influence de facteurs externes	229
Note préliminaire : cas des témoins expérimentaux	229
2.1. La température: un facteur prépondérant dans le développement de la MAB ? 231	
2.2. La ressource trophique : qualité vs quantité ?	234
3. Réponse métabolique de la palourde japonaise lors d'une exposition à <i>V. tapetis</i> ..	237
3.1. Réponse de <i>R. philippinarum</i> à <i>V. tapetis</i> : phase aigue du stress à 2 jours post-injection.....	238
3.2. Réponse de <i>R. philippinarum</i> à <i>V. tapetis</i> : phase de résistance à 7 jours post-injection.....	239
3.3. La réponse de <i>R. philippinarum</i> à <i>V. tapetis</i> : phase d'épuisement	241
3.4. Une réponse observée chez des mâles matures	242
Conclusion et perspectives.....	246
Bibliographie	254
Annexe 1.....	280

Remerciements

J'adresse mes premiers remerciements à Ingrid Arnaud et à Réjean Tremblay qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ce manuscrit de thèse. Je remercie vivement Marie-Agnès Travers et Fabrice Pernet d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Je remercie Fabienne Guérard de m'avoir encadrée durant ces trois années de thèse. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir soutenue, de m'avoir écoutée, d'avoir pris du temps pour moi, même si ton emploi du temps ne le permettait pas toujours. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et tes conseils pendant ces trois ans. Merci !

Je remercie ensuite Christine Paillard qui m'a co-encadrée pendant cette thèse. D'abord, merci de m'avoir transmis tes connaissances, ton savoir-faire et merci pour toutes ces discussions que nous avons eues. Je te remercie aussi pour ta gentillesse, ton écoute et ton aide durant ces trois ans. Je n'oublie pas non plus ces quelques jours de collocation à Rio où l'on a beaucoup échangé autour d'une caipirinha ! Merci !

Comme « à la fin, il ne peut en rester qu'un ! », je remercie maintenant Christophe Lambert, mon second co-directeur de thèse. Je te remercie d'abord d'avoir partagé avec moi tes connaissances de « cytomètreur en flux » et d'avoir toujours eu du temps à me consacrer. Je veux aussi te remercier pour ton soutien car tu as souvent été « ma bouée de sauvetage » quand tu n'étais pas « Père Castor » avec de très bonnes histoires d'ailleurs ! Merci !

Je tiens à remercier Olivier Ragueneau, directeur du LEMAR pour m'avoir accueillie au sein des équipes 1 et 2 de ce laboratoire. Je remercie également l'Ecole Doctoral des Sciences de la Mer (EDSM) et plus spécialement Fred Jean et Elisabeth Bondu pour leur disponibilité et leur aide.

Je tiens aussi à remercier Pierre Boudry, responsable du PFOM à Ifremer Brest et co-directeur du LEMAR. Je te remercie de m'avoir accueillie au sein du LPI pendant ma thèse. Merci également de m'avoir soutenue, conseillée et aidée malgré ton emploi du temps déjà très chargé.

Je remercie encore une fois mais plus spécifiquement Fabrice Pernet (« feubwaice »), merci pour toute ton aide, ton soutien, ta confiance et merci d'avoir partagé avec moi tes connaissances en stats, sur les lipides ou encore sur le métabolisme etc... je te remercie pour toutes les discussions que nous avons eues et toujours dans la bonne humeur, je te laisserai une photo avant de partir ! Je remercie également Charlotte Corporeau, merci pour ton aide, tes conseils judicieux, ta bonne humeur et ton humour. Merci aussi pour les discussions que nous avons eues, les scientifiques et même les moins sérieuses ! Merci aussi pour ton écoute et ton soutien ! Merci Cha !

Je remercie également Arnaud Huvet qui a toujours dit « oui » quand on avait besoin d'aide (merci pour les astreintes notamment !). Merci pour ta gentillesse et ton humour aussi !

J'en profite aussi pour remercier Virgile Quillien (« Virg »), pour m'avoir appris les techniques en histologie mais également pour ses conseils en biomol. Merci aussi pour ton aide quand j'avais besoin d'une âme charitable pour faire les astreintes des palourdes le week end ! Je remercie aussi Claudie Quéré de m'avoir accueillie au labo de bioch' au LPI, merci de m'avoir aidée avec notamment les lipides et les sucres. Merci !

Je tiens maintenant à remercier Philippe Miner, sans qui, l'expérimentation VIBALGO n'aurait pu être possible ! Je te remercie car, tu m'as appris à confectionner moi-même mes dispositifs expérimentaux, à cultiver les micro-algues mais tu m'as aussi appris pleins d'expressions bizarres. Merci de m'avoir fait confiance et merci encore pour toute ton aide et tes conseils précieux !

Je remercie aussi tous ceux qui ont participé aux astreintes à Ifremer avec moi pendant les week ends. J'en profite pour remercier Albert, pour m'avoir ouvert les portes d'Ifremer et avec le sourire !

Je tiens à remercier très chaleureusement l'équipe du Labex MER et notamment Corinne Floc'h Laizet pour m'avoir toujours aidée dans mes démarches administratives dans la bonne humeur, notamment pour ma mobilité au Brésil. Pendant ma thèse, j'ai eu la chance de partir deux mois dans un laboratoire brésilien dans le cadre d'une collaboration scientifique. Je remercie donc Fabiano Thompson et son équipe de m'avoir accueillie au laboratoire de microbiologie de Rio de Janeiro. Un merci particulier à Louisi de Oliveira et Diogo Tschoeke pour m'avoir enseigné les bases de la métatranscriptomique et pour votre accueil ! Muito obrigada !

Je remercie aussi Dominique Simon, que j'ai rencontrée pour la première fois à Rio, et qui trouve toujours un moment pour discuter et apporter du soutien aux étudiants, merci à toi !

Merci à la SATMAR (Société Atlantique de Mariculture) pour nous avoir fourni un nombre conséquent de palourdes et également merci à Jean-François Auvray pour les échanges que nous avons eus et ses précieux conseils. Un grand merci également à Fabien Fonteneau de m'avoir permis de visiter les claires de Bonsonge à Marennes, de m'avoir fourni un grand nombre de palourdes, mais également d'avoir pu échanger sur ses pratiques. Cela aura presque fait remonter à la surface l'agronome qui se cache au fond de moi !

Je tiens à remercier toute l'équipe du LEMAR qui m'a beaucoup aidée, je pense notamment à ces nombreuses dissections de palourdes mais également à toutes les aides et conseils que j'ai pu recevoir de vous.

Alors je vous remercie tous : Philippe, Hélène, Caroline, Nelly, Fabienne L.G., Ika, Anne-Laure, Flavia, Olivier G., Alain L., Alain M., Malwenn, Camille, Romain,... et tous ceux que j'oublie ! Un merci plus spécifique à Philippe et Hélène qui ont été mes premiers encadrants au LEMAR, pendant mon stage de M2, et qui m'ont fait entrer dans le monde de la recherche en biologie marine. Un autre merci particulier pour Adeline, tu m'as initiée à la culture de *V. tapetis* ainsi qu'à la biomol et surtout, tu as toujours été là quand j'avais besoin d'un coup de main. Merci beaucoup à toi pour le temps que tu m'as consacré et pour ta bonne humeur ! Egalement, je remercie Cédric pour son aide lors de mes débuts en thèse. Tu m'as passé le flambeau de la MAB et tu avais raison : 3 ans c'est vite passé ! Merci à toi ! Et bien sur, un grand merci aux secrétaires du LEMAR pour leur aide, leur disponibilité, leur gaieté. Merci Gene, merci Anne-So et merci Yves.

Je remercie maintenant mes collègues, doctorants ou non et amis pour tous les bons moments passés au cours de ces trois années ! Merci à Margot, « la Margette » (tu t'y feras bien un jour !), Adèl', Marie, Arthur, Laura (« Laurau quo »), Floriane, Mélanie, Bruno (j'attends toujours le bikini pour Blainville...), Fab' (pink floyd powa ! d'ailleurs ?), les anglais du LEMAR Ewan (k*r, oops !), Anna, et là, je passe « de l'autre côté du grillage » pour dire merci à Audrey (merci pour ton humour, merci !), McNouk (j'adore ton T-shirt !) et Marine, « la Meuwine » (T'es une championne !). Merci à tous pour votre aide, votre écoute, votre présence, et merci surtout d'avoir rendu ces trois années encore plus sympa et à l'occasion, un « 'tit kig ha farz » ça s'rait pas mal qu'c'est !

Je n'oublie pas non plus Mariloo (toujours là dans les bons coups, attention, Johnny est proche !), Nath' la bisounours (merci pour toutes nos soirées à refaire le monde), Marklishk (comment faire sans kebab/manga? Merci pour ces soirées hautement culturelles et toujours de très bon goût !), Benj (ne dis pas « NAN ! » ou alors « Mcdo, moules-frites et Quick » !), Madame Eshk (qui un jour m'a dit « Tu peux y aller » !), Lizou (toujours là toi aussi!), ... et ceux que j'oublie forcément ! Merci à vous !

Et je remercie ma famille (qui s'est nettement agrandie depuis le début de la thèse...). Merci Chatanl et d'JB qui ont toujours été là (que je sois à 1km ou à des milliers...), merci pour votre soutien, votre bienveillance, merci ! Je remercie aussi mes grands frères Erwan, Ronan et Steven et mes belles-sœurs Sophie, Déborah et Sabrina pour leur soutien. Je remercie également ma belle-famille : Elizabeth et Jean-Yves ainsi qu'Alex et Stéph pour leur soutien, leurs encouragements et pour les bons moments passés ensemble.

Je remercie Nicolas, pour m'avoir soutenue pendant toutes ces années. Merci à toi.

Je remercie tous ceux que j'aurais oubliés et qui auront contribué d'une façon ou d'une autre à ce travail.

Liste des figures hors publications

Figure 1 : Cycle de production de la palourde d'élevage, *Ruditapes philippinarum* (d'après Flassch, 1988).

Figure 2 : Répartition mondiale de *Ruditapes philippinarum* et dates d'introduction en Europe et aux Etats-Unis – Paillard, 2004b.

Figure 3 : Vue schématique de la face interne et externe de la coquille chez *Ruditapes philippinarum*.

Figure 4 : Vue schématique de l'anatomie de *Ruditapes philippinarum*, branchies et manteau partiellement disséqués.

Figure 5 : Schéma représentant les différentes phases du Syndrome Général d'Adaptation chez les vertébrés (selon Selye, 1950).

Figure 6 : L'hémocyte est le témoin d'une évolution commune entre la réponse au stress, la réponse inflammatoire et la réponse immunitaire – D'après Ottaviani & Franceschi (1998).

Figure 7 : Schéma récapitulatif des processus de phagocytose chez des cellules hémocytaires en contact avec des microorganismes (rouge) – D'après Paillard, 2004b.

Figure 8 : Sous-classes de PO et activités associées, modifié d'après Walker and Ferrar (1998).

Figure 9 : Le changement de conformation cis à trans de l'anion ONOO- permet la production d'une forme plus stable, le nitrate (NO₃⁻) – D'après Beckman & Koppenol, 1996.

Figure 10 : Schéma récapitulatif des défenses humorales antioxydantes mises en place chez les crustacés lors d'une exposition à un agent pathogène – modifié d'après Holmblad & Söderhall, 1999.

Figure 11 : Mécanisme de détoxication de l'anion ONOO- en nitrite NO₂⁻ par l'intervention de la Se-GPx – modifié d'après Sies et al., 1997 et Dubuisson et al., 2004.

Figure 12 : Schéma hypothétique des principales voies de production et de prise en charge des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote chez les mollusques bivalves.

Figure 13 : Schéma illustrant les relations entre la production d'espèces réactives et leur prise en charge.

Figure 14 : A. Phagocytose de *M. sydneyi* par un granulocyte de *S. glomerata* et début de mélanisation autour des parasites (indiquée par les flèches) et B. L'encapsulation mélanotique est presque achevée, le granulocyte et les parasites phagocytés sont presque entièrement mélanisés – D'après Butt & Raftos, 2008.

Figure 15 : Photographie d'une coquille de palourde *Ruditapes philippinarum* présentant un dépôt de conchioline indiqué par les flèches sur chaque valve – D'après Paillard, 2004b.

Figure 16 : Coupe transversale d'une coquille présentant les signes cliniques de la MAB – d'après Paillard & Le Pennec, 1993.

Figure 17 : Photographie du bord d'une coquille présentant les premiers signes cliniques de la MAB sous la forme de petites taches brunes – D'après Paillard, 2004b.

Figure 18 : Schéma de la surface interne de la coquille d'une palourde et des compartiments qui la constituent – D'après Paillard & Maes, 1994.

Figure 19 : Photographie du bord d'une coquille présentant des dépôts bruns visibles par transparence sous des couches coquillères néoformées. D'après Paillard, 2004b.

Figure 20 : Schéma récapitulatif de la mise en place de l'infection de *R. philippinarum* par *V. tapetis* – Adapté d'après Paillard, 2004b.

Figure 21 : Photographie d'une palourde ayant subi plusieurs arrêts de croissance (indiqués par les flèches).

Figure 22 : Schéma du dispositif de l'expérimentation préliminaire

Figure 23: Photographie du dispositif utilisé pour l'expérimentation 2

Figure 24 : Design expérimental de l'expérimentation 1

Figure 25 : Design expérimental de l'expérimentation 2 – étude individuelle

Figure 26 : A. Prélèvement de l'hémolymphe chez *R. philippinarum* – B. Vérification de la qualité du prélèvement d'hémolymphe au microscope.

Figure 27 : Prélèvement des fluides extrapalléaux chez *R. philippinarum*

Figure 28 : Clé de détermination des signes cliniques associés à la MAB chez *Ruditapes philippinarum*, établie par Paillard & Maes (1994).

Figure 29 : Exemples d'images obtenues pour une coquille de *R. philippinarum* saine (A) et une coquille présentant des signes cliniques de la MAB (B). Les zones entourées d'un liseré blanc, rouge et jaune représentent respectivement les surfaces de coquille, d'anneau brun et de réparation coquillère.

Figure 30 : Principe du dosage de la SOD (SOD Assay Kit, Sigma-Aldrich, France).

Figure 31 : Exemple de suivi de l'absorbance ($\lambda = 340 \text{ nm}$) en fonction du temps dans les surnageants de glandes digestives, branchies et manteaux de *R. philippinarum* lysés dans le tampon « BLOT » ou « PBS » dans le cadre du dosage de la t-GPx.

Figure 32 : Exemple de suivi de l'absorbance ($\lambda = 340 \text{ nm}$) en fonction du temps dans les surnageants de glandes digestives, branchies et manteaux de *R. philippinarum* lysés dans le tampon « BLOT » ou « PBS » dans le cadre du dosage de la GST.

Figure 33 : A. Montage pour le développement de la coloration – d'après Knipp & Vasak, 2000. B. Absorbance en fonction de l'activité iNOS purifiée chez la souris et de la durée d'incubation à 95 °C. C. Activités iNOS dosées dans le manteau, les branchies et la glande digestive de *R. philippinarum* en fonction du tampon de lyse protéique utilisé (« PBS » ou « BLOT »).

Figure 34 : A. Schéma explicatif de la méthode PCNM (d'après Borcard et Legendre, 2002). B. Diagramme de Venn représentant la partition de la variance du modèle où E, E x X, X et ϵ sont les parts de la variance du modèle expliquées respectivement par l'environnement, l'interaction environnement x temps et les résidus (part expliquée ni par l'environnement, ni par le temps ou leur interaction).

Figure 35 : Valeurs moyennes ($n=3$, \pm écart-type) de l'activité SOD et PO dans le plasma de l'hémolymphe de *Ruditapes philippinarum* (respectivement A et B) et de l'activité de la SOD, PO et CAT dans les branchies de *Ruditapes philippinarum* (respectivement C, D et E) en fonction du temps (en heures).

Figure 36 : Diagramme de Venn associé à l'analyse de partition de la variance du modèle $Y=f(X,E)$, avec Y, la matrice des variables SOD, CAT et PO ; X, la matrice des vecteurs propres associés aux valeurs propres positives issues de l'analyse PCNM et E, la matrice des variables environnementales.

Figure 37 : Représentation schématique de l'interaction hôte-pathogène-environnement dans le cadre de la maladie de l'anneau brun.

Figure 38 : Schéma récapitulatif (hypothétique) de la réponse de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis* et ne présentant aucun signe clinique apparent de la maladie de l'anneau brun deux jours post-injection.

Figure 39 : Schéma récapitulatif de la réponse de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis* et ne présentant aucun signe clinique apparent sept jours post-injection.

Figure 40 : Schéma récapitulatif de la réponse de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis* exprimant la maladie de l'anneau brun sept jours post-injection.

Figure 41 : Schéma bilan simplifié représentant l'influence des facteurs externes et internes, étudiés au cours de cette thèse, sur l'interaction *Ruditapes philippinarum*-*Vibrio tapetis*-environnement.

Figure 42 : Schéma bilan de la modulation de l'activité des enzymes liées au système antioxydant et au système immunitaire inné chez *Ruditapes philippinarum* exposée à *Vibrio tapetis* par injection en cavité extrapalléale périphérique.

Liste des tableaux hors publications

Tableau 1 : Systématique de *R. philippinarum*

Tableau 2 : Composition du milieu de culture Zobell liquide utilisé pour les souches *V. tapetis*

Tableau 3 : Composition du milieu de Conway

Tableau 4 : Composition du milieu de culture Zobell solide utilisé pour la culture de *V. tapetis*

Tableau 5 : Tableau récapitulatif de la constitution des pools selon le régime algal, l'injection, l'occurrence de la MAB, et le temps de prélèvement.

Tableau 6: Composition de la solution de Davidson modifiée

Tableau 7 : Etapes de déshydratation, clarification et paraffinage des échantillons

Tableau 8 : Bains successifs et temps de passage des échantillons lors de la coloration

Tableau 9 : Nomenclature et description des stades de maturité en fonction du sexe chez *Ruditapes philippinarum* (Drummond et al., 2006).

Tableau 10 : Composition du tampon « BLOT »

Tableau 11 : Composition du tampon « PBS »

Liste des abréviations

Acetyl-CoA	Acétyl-coenzyme A
ACTH	Hormone corticotrope
AIF	« Allograft inflammatory factor » (facteur d'allogreffe inflammatoire)
AG	Acides gras
AGPI	Acides gras poly-insaturés
ATP	Adénosine triphosphate
BH ₄	Tétrahydrobioptérine
CAT	Catalase
CDNB	Chlorodinitrobenzène
CHT	Concentration hémoocytaire totale (hémocytes circulants)
CS	Citrate synthase
Cu/Zn SOD	Superoxyde dismutase Cu/Zn
CYP	Cytochrome P-450
DA	Dopamine
DTNB	Acide Dithiobisnitrobenzoïque
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
EGTA	Acide éthylène glycol tétracétique
EMSF	Eau de Mer Filtrée Stérile
ERA	Espèces réactives de l'Azote
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FADH/FAD+	Flavine adénine dinucléotide réduite/oxydée
FE	Fluides Extrapalleaux
GPx	Glutathione peroxydase
GSH/GSSG	Glutathion réduit/oxydé
GST	Glutathion-S-transférase
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HK	Hexokinase
IL	Interleukines
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
L-ARG	L-arginine
LAP	Leucine aminopeptidase
L-CIT	L-citrulline
L-NMMA	L-N ^G -monomethyl Arginine
LYS	Lysozyme
MAB	Maladie de l'Anneau Brun
MMAP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
Mn SOD	Superoxyde dismutase Mn
NA	Noradrénaline
NADH/NAD+	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit/oxydé
NADPH/NDAP+	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit/oxydé
NO	Monoxyde d'azote (ou oxyde nitrique)
Non Se-GP	Glutathion peroxydase selenium indépendante
PA	Phosphatase acide
PAM	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PCB	Polychlorobiphényle

PK	Protéine kinase
PGRP	“Peptidoglycans-recognition proteins” (protéines de reconnaissance des peptidoglycans)
PO	Phénoloxydase
POMC	Pro-opiomelanocortine
proPOs	Prophénoloxydases
proPO-AS	Prophenoloxidase Activating System (Système d’activation de la prophénoloxydase)
PRP	Pattern recognition proteins (Protéines de reconnaissance des motifs)
proPXN	Propéroxyneptine
PXN	Péroxyneptine
RRP	Récepteurs de reconnaissance des pathogènes
SATMAR	Société ATLantique MARiculture
Se GPx	Selenium glutathione peroxydase
SGA	Syndrome général d’adaptation
SOD	Superoxyde dismutase
SRS	Shell Repair Stage (Stades de réparation de la coquille)
TGF-β	Transforming growth factor – β (facteur de croissance transformant β)
TNF	Tumor necrosis factor (facteur de nécrose tumorale)
Tris-HCl	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Trx	Thiorédoxine
TrxP	Thiorédoxine peroxydase
TrxR	Thiorédoxine réductase
TLR	Toll-like receptors
UV	Ultraviolets
XO	Xanthine oxydase

Liste des publications et communications

Publications:

- ⌘ Le Bris C., **Richard G.**, Paillard C., Lambert C., Séguineau C., Gauthier O., Pernet F., Guérard F. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* – Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015; 42: 16-24

- ⌘ **Richard G.**, Le Bris C., Guérard F., Lambert C., Paillard C. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* – Part II: Combined effect of temperature and two *V. tapetis* strains. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015; 44: 79-87

- ⌘ Bidault A., **Richard G.**, Le Bris C., Paillard C. Development of a Taqman real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio tapetis* in extrapallial fluids of clams. En révision, PeerJ. – Annexe 1

- ⌘ **Richard G.**, Miner P., Bidault A., Pernet F., Corporeau C., Boudry P., Guérard F., Paillard C.*, Lambert C.* Brown Ring Disease in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: effect of algal diet quality and reproduction status. Soumis à PLOS ONE – Novembre 2015

- ⌘ **Richard G.**, Guérard F., Corporeau C., Lambert C., Paillard C., Pernet F. Metabolic response of clam *Ruditapes philippinarum* exposed to its pathogen *Vibrio tapetis* in relation to diet. Soumis à *Developmental and Comparative Immunology* - Novembre 2015

Communications

Orales:

⌘ **Richard G.**, Miner P., Le Goïc N., Bidault A., Quillien V., Corporeau C., Pernet F., Lambert C., Boudry P., Paillard C., Guérard F. « Influence of diet and sex on host-pathogen relationship: the case of the manila clam (*Ruditapes philippinarum*) and its pathogen *Vibrio tapetis* », NSA (National Shellfisheries Association), 22 au 26 mars 2015, Monterey, Californie, USA.

Affichées:

⌘ Le Bris C., **Richard G.**, Paillard C., Lambert C., Guérard F. « Study of phenoloxidase and superoxide dismutase activities associated with *Vibrio tapetis* infection in the manila clam, *Venerupis philippinarum* », Marinebrazil (Building the Marine Science – French Brazilian Meeting), 3 au 8 novembre 2013, Buzios, Brésil.

⌘ **Richard G.**, Le Bris C., Paillard C., Lambert C., Guérard F. « Combined effect of *Vibrio tapetis* infection and temperature challenge on phenoloxidase and superoxide dismutase activities in the manila clam, *Venerupis philippinarum* », Marinebrazil (Building the Marine Science – French Brazilian Meeting), 3 au 8 novembre 2013, Buzios, Brésil.

Introduction

Contexte général

L'élevage de la palourde ou vénériculture est une activité très récente en France puisqu'elle a été mise en place au cours des années 1970. Plus précisément, en 1972, la Société Atlantique de Mariculture (SATMAR), spécialisée dans la commercialisation d'huîtres et de palourdes à différents stades de développement de l'animal, a introduit la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* à des fins d'aquaculture (Flassch and Leborgne, 1992). L'importation de la palourde japonaise a fait suite à une volonté de diversification dans la production contrôlée des bivalves. En effet, dans les années 1960, de nombreux épisodes d'épizooties ont eu lieu dans les élevages d'huîtres plates en Europe, engendrant une dépendance vis-à-vis de l'huître creuse. Ainsi, la vénériculture représentait une solution intéressante face aux risques associés à la monoculture (Flassch, 1988).

Entre 1975 et 1986, plusieurs programmes nationaux et régionaux ont étudié la faisabilité de ce type d'élevage d'un point de vue technique (Flassch, 1988). Dans cette optique, différentes études ont porté sur la comparaison de la palourde native européenne, *Ruditapes decussatus*, et de la palourde japonaise (Bodoy et al., 1980; Beninger and Lucas, 1984; Bodoy et al., 1986). Finalement, *R. philippinarum*, présentant une meilleure croissance et un meilleur taux de recrutement que la palourde européenne, a été largement utilisée en aquaculture et s'est répandue naturellement sur les côtes françaises (Sanchez et al., 2014). Par exemple, dans le bassin d'Arcachon, la population naturelle de palourdes japonaises a supplanté celle de palourdes européennes et représentait 99 % de la biomasse sur une zone de 47 km² (Sanchez et al., 2014). Similairement, la population naturelle de *R. philippinarum* dans le golfe du Morbihan s'est également développée au dépens de *R. decussatus*, ce qui pourrait être en partie dû aux périodes de reproduction plus étendues et au plus grand nombre de pontes observés chez la palourde japonaise (Laruelle et al., 1994). Enfin, bien que *R. philippinarum* ne soit pas la principale espèce de bivalves produite en France, il s'agit d'une espèce à valeur commerciale élevée. En effet, sa production en France génère plus de 6,8 millions de dollars pour 720 tonnes produits en 2013 (FAO, 2013).

Le cycle de production de la palourde japonaise en aquaculture est marqué par différentes étapes clés résumées dans la Figure 1. La première de ces étapes consiste en la production contrôlée d'un naissain en écloserie, contrairement à la conchyliculture classique où le naissain est directement capté dans le milieu. Ainsi, l'écloserie effectue d'abord l'élevage larvaire des palourdes en milieu contrôlé puis un pré-grossissement qui a lieu en milieu naturel la plupart du temps. Lorsque le naissain atteint la taille de 15-18 mm, il est transféré chez le vénériculteur pour l'étape de grossissement en milieu naturel (en claires ou sur estran). Enfin, lorsque les palourdes adultes atteignent la taille de 35 mm, elles sont récoltées puis commercialisées.

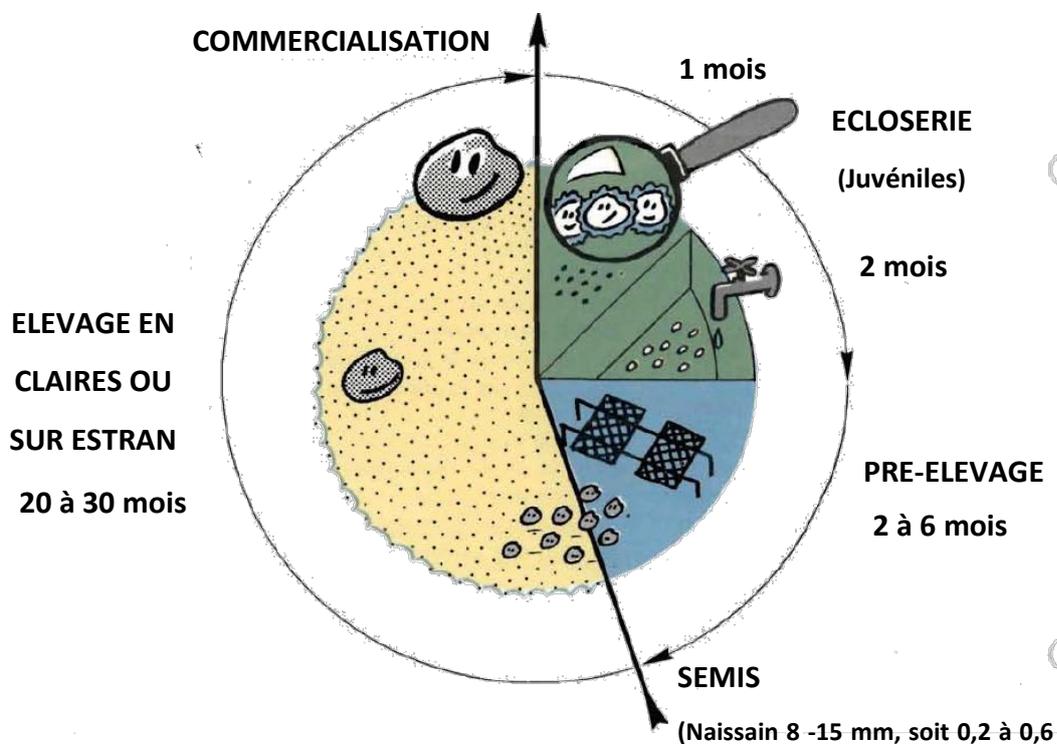


Figure 1 : Cycle de production de la palourde d'élevage, *Ruditapes philippinarum* (d'après Flassch, 1988).

À part l'étape d'élevage larvaire qui est opérée en milieu contrôlé, toutes les étapes de production de la palourde peuvent être effectuées en milieu naturel. Ainsi, les populations cultivées et sauvages sont directement soumises aux modifications de l'environnement, qu'elles soient de nature biotique (prédation, parasitisme, infections bactériennes, virales...) ou abiotique (température, salinité, type et granulométrie du sédiment...). Ces variations ou stimuli environnementaux, ou encore stressseurs, peuvent induire une altération de l'état physiologique des animaux ; cette altération est qualifiée de

stress¹ (Selye, 1950 ; Bayne, 1975). De ce fait, ces stressseurs peuvent entrainer des mortalités dans les populations de palourdes (sauvages et cultivées) et donc une chute de la production.

Notamment, à la fin des années 1980, un tel phénomène, marqué par de fortes mortalités, a été observé dans les parcs vénéricoles situés dans le pays des Abers (Nord Finistère, France) et également dans le bassin d'Arcachon (Gironde, France). Dans cette dernière zone, les mortalités de palourdes observées ont été reliées à la présence de plusieurs prédateurs, la dorade royale (*Sparus aurata*) et le baliste (*Balistes capristus*) (Robert and Parra, 1991). Dans la zone des Abers, les mortalités de palourdes ont été associées à la Maladie de l'Anneau Brun (MAB) dont le principal signe clinique est le dépôt d'une couche de conchioline de couleur brune sur la surface interne de l'animal (Paillard et al., 1989; Paillard and Maes, 1990).

La MAB est une vibriose causée par la bactérie pathogène *Vibrio tapetis* qui, après être entrée dans la cavité palléale de l'animal, colonise la lame périostracale de celui-ci entraînant sa dégradation. Puis, l'agent pathogène pénètre dans la cavité extrapalléale où il poursuit la colonisation des fluides extrapalléaux (FE), du manteau et de la lame périostracale (Paillard, 2004a). La dégradation du périostracum induirait une réaction des cellules du bord du manteau se concrétisant dans la formation de sécrétions coquillères visant à encapsuler les bactéries (Paillard et al., 1989; Paillard, 2004a). Si l'animal ne parvient pas à recalcifier par-dessus le dépôt de conchioline (processus de réparation coquillère), celui-ci peut provoquer des lésions au niveau du manteau de la palourde. La conséquence de telles blessures réside dans l'entrée du pathogène dans les organes et les fluides de l'animal, provoquant ainsi la septicémie puis la mort de celui-ci.

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle prépondérant des facteurs environnementaux sur l'interaction hôte-pathogène *R. philippinarum*-*V. tapetis*. Parmi ces facteurs, la température semble être un déclencheur crucial dans le développement de la maladie. En effet, celle-ci est associée à des températures « froides », avec une température

¹ *Stricto sensu*, le stress est la conséquence d'une modification de l'environnement, qui résulte en l'altération de l'état physiologique de l'organisme, et non la cause de celle-ci. Par abus de langage, les mots « stress » et « stressseurs » sont parfois employés pour désigner le stimulus environnemental entraînant des modifications physiologiques.

optimale pour son développement se situant autour de 14 °C, contrairement aux cas de nombreuses vibrioses marines (Paillard et al., 2004a). Un autre facteur s'avérant être un facteur aggravant dans le développement de la MAB chez *R. philippinarum* est l'apport trophique (Plana and Le Pennec, 1991; Plana et al., 1996). Selon la définition de Snieszko (1974), la MAB est donc une interaction complexe entre d'une part, un hôte caractérisé par ses propres facteurs internes le rendant plus ou moins sensible, d'autre part, un pathogène caractérisé par sa virulence, et enfin, un environnement plus ou moins favorable au développement de la maladie.

La MAB se traduit chez *R. philippinarum* par des modifications de nombreux paramètres physiologiques tels que les paramètres immunitaires et métaboliques. En effet, s'il a été montré que les hémocytes de la palourde japonaise étaient capables de phagocyter *V. tapetis* (Paillard, 2004b), cette bactérie serait capable en retour d'inhiber les processus de phagocytose en provoquant la perte des filopodes et l'arrondissement de ces cellules (Choquet et al., 2003). De plus, cette bactérie induirait une inhibition de la production d'espèces toxiques pour les agents pathogènes, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) au niveau des hémocytes de *R. philippinarum* (Choquet, 2004). Egalement, la production d'espèces réactives de l'azote (ERA) par les hémocytes *via* l'activation de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), a été associée à la réponse immunitaire de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis* (Jeffroy and Paillard, 2011).

Plus récemment, un système enzymatique impliqué dans la réponse immunitaire innée, le système des phénoloxydases (PO), a été caractérisé chez *R. philippinarum* (Le Bris, 2013). Ce système est à l'origine de la production de la mélanine, un des composants de l'anneau brun, et de composés dérivés toxiques largement impliqués dans la réponse immunitaire non-spécifique.

Outre le système des PO, un autre système enzymatique, le système antioxydant, indirectement relié à la réponse immunitaire innée, peut être mis en jeu chez les invertébrés marins exposés à des stressseurs biotiques et/ou abiotiques. Ces enzymes sont impliquées dans la détoxification des ERO qui sont produites en quantité importante lorsque l'organisme doit faire face à des perturbations de son environnement. Ainsi, elles permettent la régulation de ces espèces afin d'assurer l'homéostasie du potentiel redox

cellulaire. Ces enzymes ont déjà fait l'objet d'études chez de nombreux mollusques bivalves exposés à des pollutions par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PBC), les métaux lourds mais également suite à des modifications de température, de salinité, d'oxygénation (Manduzio et al., 2003; Monari et al., 2005, 2007). Ce système enzymatique est également impliqué dans la réponse immunitaire de bivalves exposés à des agents pathogène tels que les vibrions (Canesi et al., 2010; Genard et al., 2013). Le rôle de ces enzymes dans la réponse de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis* reste encore inexploré.

Les réponses physiologiques de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis* ont également été associées à des modifications métaboliques, notamment au niveau des réserves énergétiques. En effet, Plana et al. (1996) ont montré que les réserves en glycogène des animaux infectés étaient significativement réduites par rapport aux animaux sains. Ces travaux ont conduit à l'hypothèse suivante : les mortalités massives observées chez les animaux infectés sur le terrain seraient dues à des altérations de leur activité métabolique. Cependant, jusqu'à maintenant, aucune mesure d'activité enzymatique liée au métabolisme énergétique de la palourde n'a été menée pour confirmer cette hypothèse.

Problématique et objectifs de la thèse

La problématique générale de cette thèse était de mieux comprendre la réponse adaptative de la palourde japonaise dans le cadre de l'interaction hôte-pathogène-environnement qu'est la MAB. Ainsi, deux principaux objectifs ont été définis. Le premier objectif visait à évaluer l'importance de certains facteurs sur le développement de la MAB :

- Facteurs environnementaux (température, régime algal)
- Facteurs inhérents au pathogène (différences de virulence entre deux souches)
- Facteurs inhérents à l'hôte (statut immunitaire, statut de reproduction)

Le second objectif était de caractériser les réponses physiologiques de la palourde associées à l'exposition à *V. tapetis* et en fonction des facteurs cités ci-dessus. Pour ce faire, nous avons opté pour une approche majoritairement biochimique en étudiant l'activité d'enzymes liées au métabolisme des glucides en association avec la mesure des réserves énergétiques, et également l'activité d'enzymes liées au système immunitaire et aux

défenses antioxydantes. La seconde étude présentée dans ce manuscrit a utilisé, en plus de cette approche biochimique, une approche cellulaire en étudiant les paramètres associés aux cellules immunocompétentes que sont les hémocytes.

Afin de répondre à ces objectifs, plusieurs expérimentations d'infection par *V. tapetis* en milieu contrôlé ont été menées sur des palourdes japonaises adultes, calibrées, de taille commercialisable.

Dans un premier temps, une synthèse bibliographique a été effectuée et porte sur le modèle biologique, les réponses physiologiques des bivalves mollusques exposés à des stressseurs biotiques et/ou abiotiques et, plus particulièrement dans le cadre de la MAB. Puis, les matériels et méthodes utilisés au cours de cette thèse sont présentés à la suite de cet état de l'art.

Suite à cela, la 1^{ère} partie de cette thèse présente brièvement les résultats d'une première étude pré-expérimentale visant à fixer les paramètres de prélèvement pour les expérimentations. Dans ce chapitre seront également présentés les résultats d'une première expérimentation d'infection par *V. tapetis* en milieu contrôlée. L'objet de cette étude était d'évaluer l'impact de la température et de la virulence de plusieurs souches de *V. tapetis* sur la réponse physiologique de *R. philippinarum* (températures testées : 15 et 22 °C ; souches de *V. tapetis* testées : CECT 4600^T et LP2). Plus précisément, les réponses immunitaire et antioxydante de la palourde ont été suivies durant 30 jours post-exposition au travers des activités enzymatiques PO et SOD. De plus, le suivi des signes cliniques de la MAB durant cette période a permis d'étudier la dynamique temporelle de la maladie. Les résultats de cette étude représentent la majeure partie l'objet de cette 1^{ère} partie sous la forme d'un article déjà publié.

Après avoir caractérisé l'influence de la température et la virulence de *V. tapetis* comme facteurs influençant directement la réponse adaptative de la palourde à ces stressseurs, nous nous sommes intéressés à l'impact d'un second facteur environnemental dans cette interaction *R. philippinarum*-*V. tapetis* : la qualité du régime algal en termes de composition en acides gras (AG). Sur la base des travaux menés par Delaporte et al., (2003), deux algues contrastées en termes de composition en acides gras ont été utilisées comme apport trophique pour *R. philippinarum*: *Chaetoceros calcitrans* et *T-Isochrysis aff. Galbana*,

clone Tahitian (T-Iso). Suite à une période de conditionnement à ces deux régimes mono-algaux, les animaux tests ont été injectés avec une solution contenant *V. tapetis*, les témoins ont soit été injectés avec de l'eau de mer filtrée stérile ou n'ont pas été injectés. Par ailleurs, les animaux utilisés pour cette expérimentation étant entrés en gamétogénèse, l'effet de ce facteur a également été pris compte.

Cette deuxième expérimentation a fait l'objet de deux approches complémentaires. Premièrement, une étude individuelle visant à caractériser l'effet de la qualité du régime algal, de la condition d'injection et également du statut de reproduction de l'animal sur le développement de la MAB. Pour cela, nous avons étudié la prévalence et l'intensité de la MAB, les paramètres hématocytaires de *R. philippinarum* et la présence de *V. tapetis* dans les fluides extrapalléaux des animaux. Les résultats issus de cette première approche sont exposés sous la forme d'un article et discutés dans la 2^{ème} partie.

Sur la base des résultats obtenus au cours de cette première étude, nous avons opté pour une étude des réponses physiologiques de *R. philippinarum* par pools d'individus. Cette approche nous a permis d'étudier un grand nombre de paramètres physiologiques en fixant pour chaque pool les différentes conditions testées. Ainsi, les réponses immunitaire, antioxydante et métabolique de *R. philippinarum* ont été évaluées par la mesure d'activités enzymatiques clés en association avec l'évaluation des réserves énergétiques des animaux et la composition en AG au niveau de différents organes cibles. Cette seconde approche fait l'objet de la 3^{ème} partie de ce manuscrit.

Enfin, la dernière partie de ce manuscrit intègre, dans une discussion générale, les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse. Une conclusion générale et les perspectives de ce travail de thèse sont également développées.

Etat de l'art

1. La palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*

1.1. Systématique et principales caractéristiques

La classification taxonomique de la palourde japonaise est présentée dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Systématique de *R. philippinarum*

Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Mollusca</i>
Classe	<i>Bivalvia</i> (Linné, 1856)
Ordre	<i>Veneroidea</i> (Adams & Adams, 1856)
Famille	<i>Veneridae</i> (Rafinesque, 1815)
Genre & Espèce	<i>Ruditapes philippinarum</i>

Dans le règne animal, la palourde japonaise appartient à l'embranchement des mollusques étant donné qu'elle possède un corps mou, non segmenté à symétrie bilatérale et enveloppé par un manteau qui sécrète les éléments minéraux nécessaires à la formation de la coquille (Gosling, 2008).

La coquille de la palourde est formée par deux parties articulées, ou valves, ce qui la place dans la classe des bivalves ou encore lamellibranches au vu de ses branchies en forme de lamelles. D'un point de vue évolutif, la compression latérale du corps dans leur coquille a induit un déplacement de la bouche ne lui permettant plus d'assurer son rôle dans le captage initial de la nourriture (Gosling, 2008). Une autre caractéristique des bivalves est la taille importante des branchies qui assurent un rôle dans la nutrition en plus de la respiration. Les échanges d'éléments avec le milieu extérieur se font essentiellement par les siphons (inhalant et exhalant) qui sont des extensions du manteau et permettent à ces animaux de vivre à des profondeurs plus importantes sous le sédiment.

Enfin, la présence d'un pied est une caractéristique importante chez certains bivalves, comme la palourde, puisque celui-ci permet le déplacement dans le sédiment afin de s'enfouir et donc de se protéger de prédateurs (Gosling, 2008). La palourde japonaise fait partie de l'ordre des vénéroïdes puisqu'elle présente une coquille épaisse, équivalve et non

équilatérale, qu'elle possède des dents cardinales et que ses siphons sont plus ou moins fusionnés (Adams & Adams, 1856). Enfin, l'appartenance de *R. philippinarum* à la famille des vénéridés est due à la présence d'ornementations concentriques et rayonnantes sur sa coquille dont la forme ovale (Rafinesque, 1815).

1.2. Biologie de la palourde japonaise

1.2.1. Aire de répartition et écologie

Les populations de palourdes japonaises sauvages, sont présentes dans les Philippines, les mers de Chine, en mer du Japon, en mer d'Okhotsk ainsi qu'autour des îles Kouriles (Gouletquer, 1997). Etant donnée sa valeur commerciale, elle a été importée dans de nombreuses régions, étendant ainsi un peu plus son aire de répartition (Figure 2). En 1936, *R. philippinarum* a été accidentellement introduite sur la côte pacifique nord des Etats-Unis lors d'imports de naissains d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas* (Chew, 1989). Depuis lors, la palourde japonaise, s'étant rapidement acclimatée, est présente du nord de la Californie aux Etats-Unis jusqu'à la Colombie Britannique au Canada (Magoon and Vining, 1981).

La palourde japonaise présente alors un grand potentiel pour la vénériculture en Europe puisque sa croissance ainsi que son taux de remplissage sont meilleurs que ceux de la palourde croisée d'Europe, *Ruditapes decussatus* (Flassch and Leborgne, 1992). De plus, le développement de l'aquaculture par la présence d'écloseries commerciales et grâce aux importations d'animaux a permis de nombreux transferts au sein de l'Europe (Ponurovsky and Yakovlev, 1992). La société atlantique de mariculture (SATMAR) est à l'origine de l'introduction de la palourde japonaise en France dès 1972 (Flassch and Leborgne, 1992). Parallèlement, dans les années 1980, l'activité ostréicole traditionnelle connaît un déclin en France et une diversification de l'activité des ostréiculteurs avec la vénériculture apparaît être une bonne solution afin d'assurer leurs revenus (Gouletquer et al., 1988).



Figure 2 : Répartition mondiale de *Ruditapes philippinarum* et dates d'introduction en Europe et aux Etats-Unis – Paillard, 2004b.

L'établissement de populations de palourdes japonaises dans les zones où elle a été introduite témoigne de sa grande capacité d'acclimatation. En effet, la palourde est un bivalve benthique, fouisseur et suspensivore, vivant essentiellement dans les zones lagunaires et estuariennes, dans des sédiments de type vaseux à sableux caractérisés par des granulométries très diverses (Flye-Sainte-Marie et al., 2008). Ces environnements sont par ailleurs associés à des modifications de facteurs tels que l'oxygénation, la température, la salinité, la turbidité, la pollution, la présence d'agents pathogènes ou encore la présence de ressources trophiques (Daou and Gouletquer, 1988; Gouletquer et al., 1988; Gosling, 2008). Ainsi, *Ruditapes philippinarum* peut vivre dans des eaux dont la température varie entre 0 et 30 °C avec un optimum thermique pour sa croissance se situant entre 20 et 24 °C (Mann, 1979; Gouletquer et al., 1988, 1989; Laing and Child, 1996; Solidoro et al., 2000). De plus, la palourde japonaise est retrouvée dans des milieux où la gamme de salinité peut s'étendre de 10 à 35 ‰ et survit à de fortes dessalures (Gouletquer et al., 1988; Elston et al., 2003). Cet animal fait preuve de résistance en conditions hypoxiques et peut survivre à de très basses concentrations en oxygène (inférieures à 1 % d'oxygène à 25 °C) pendant quelques jours (Uzaki et al., 2003).

1.2.2. Anatomie

Un schéma récapitulant les différentes parties anatomiques de la palourde est présenté dans les Figures 3 et 4.

La coquille

Sur la partie dorsale de la coquille, se situe la charnière avec ses trois dents cardinales permettant la fermeture des valves (Gosling, 2008; Trinkler, 2009). Au niveau postérieur par rapport à la charnière, se situe la zone ligamentaire permettant l'ouverture passive des deux valves lorsque les muscles adducteurs contrôlent la fermeture active de celles-ci (Trinkler, 2009). La coquille des palourdes est constituée de deux couches coquillères : la couche externe qui a une structure prismatique et la couche interne qui a une structure homogène (Paillard and Le Pennec, 1993; Gosling, 2008). La couche externe est composée de cristaux d'aragonite ou de calcite prismatiques se développant parallèlement de la charnière vers le bord de la coquille (Trinkler, 2009). A sa surface extérieure, de nombreuses stries sont dessinées et sont de deux types : les stries concentriques (parallèles au bord de la coquille) associées à la croissance de l'animal et les stries d'ornementation qui sont perpendiculaires aux stries concentriques (Trinkler, 2009). La couche interne homogène de la coquille est composée de calcaire et est également qualifiée de couche porcelanée nacrée. Sur sa surface intérieure l'impression palléale, l'impression des muscles adducteurs et l'impression des siphons (sinus palléal) correspondent respectivement à l'ancrage du manteau des muscles adducteurs (antérieur et postérieur) et des siphons sur la coquille (Trinkler, 2009).

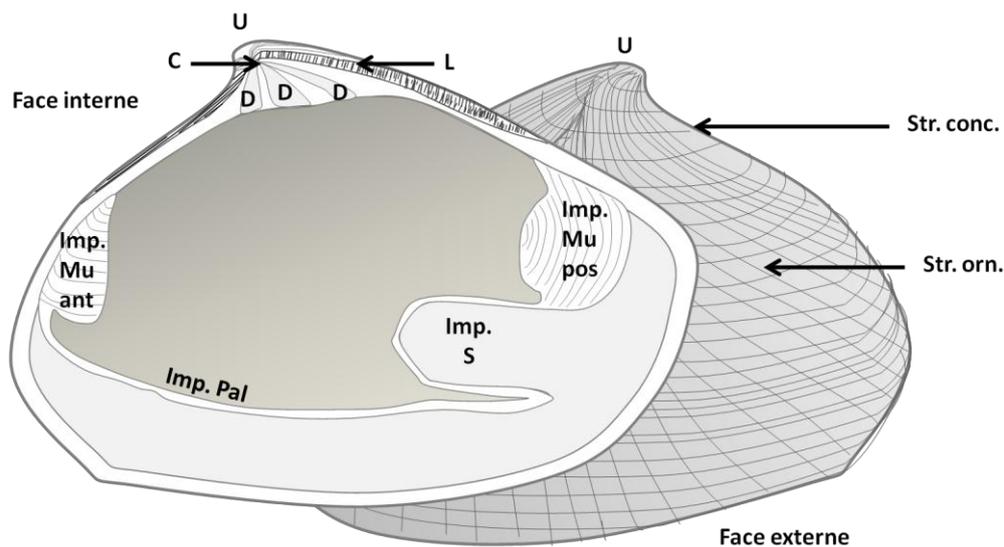


Figure 3 : Vue schématique de la face interne et externe de la coquille chez *Ruditapes philippinarum*.

Légende : Face interne : U = umbo ; C = charnière ; L = ligament ; D = dent cardinale ; Imp. Mu ant. = impression muscle adducteur antérieur ; Imp. Mu pos. = impression muscle adducteur postérieur ; Imp. Pal = impression palléale ; Imp. S = impression des siphons. Face externe : U= umbo ; Str. Conc. = strie concentrique ; Str. Orn. = strie ornementale.

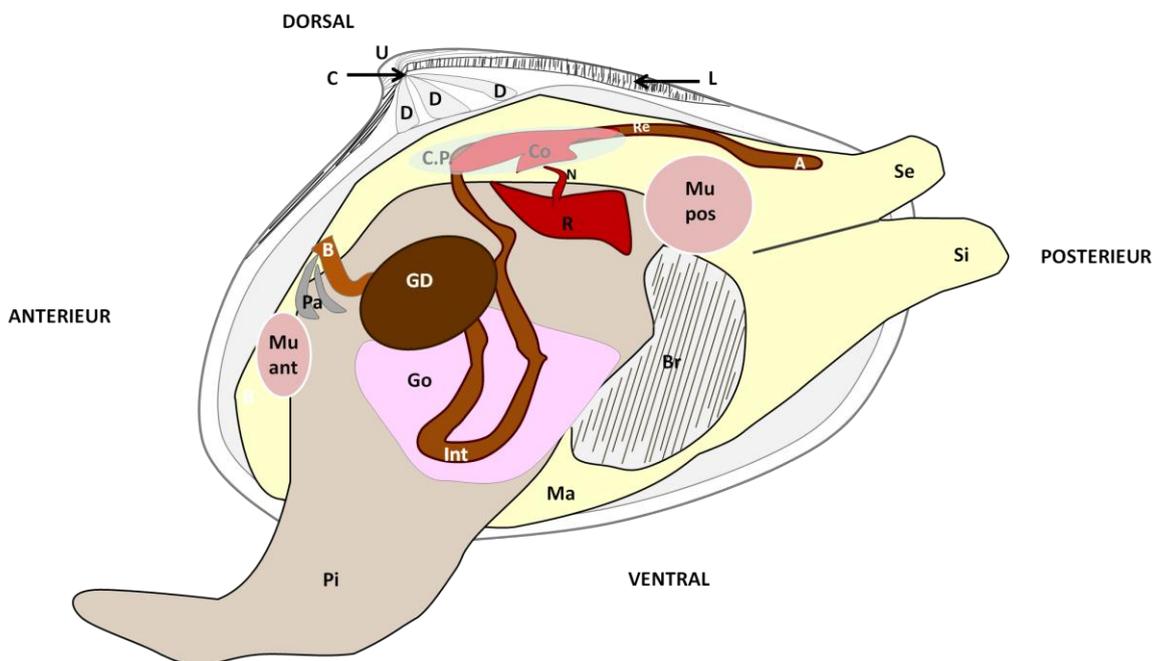


Figure 4 : Vue schématique de l'anatomie de *Ruditapes philippinarum*, branchies et manteau partiellement disséqués.

Légende : U = umbo ; C = charnière ; D = dents cardinales ; L = ligament ; Ma = manteau ; Re = rectum ; A = anus ; Se = siphon exhalant ; Si = siphon inhalant ; Mu pos = muscle adducteur postérieur ; Mu ant = muscle adducteur antérieur ; C = cœur ; C.P. = cavité péricardique ; N = néphrostome ; R = rein ; Int = intestin ; GD = glande digestive ; Br = branchies ; Go = gonade ; Pa = palpes labiaux ; B = bouche ; Pi = pied.

Systeme respiratoire

Chez les bivalves lamellibranches, les branchies sont particulièrement développées et forment quatre feuillets suspendus par l'axe cténidial qui est fusionné avec le manteau de l'animal (Paillard and Le Pennec, 1993; Gosling, 2008). Chaque branchie est constituée de filaments en forme de « W », lui conférant ainsi une large surface très adaptée aux échanges gazeux. Des cils sont présents à la surface de ces filaments (Paillard and Le Pennec, 1993) et permettent la mise en mouvement de l'eau au sein de la cavité palléale mais également le passage et le tri des particules. Ainsi, les branchies ont une structure à la fois adaptée à la fonction respiratoire mais aussi à la fonction de nutrition chez le bivalve.

Systeme digestif

Une fois les particules filtrées par les branchies, elles sont acheminées jusqu'aux palpes labiaux qui trient la nourriture et l'amènent vers la bouche. Une fois dans l'œsophage, la nourriture est ensuite dirigée vers l'estomac qui est entouré d'une glande digestive de couleur brune à noire et qui est le siège majeur de la digestion intracellulaire (Gosling, 2008). Les déchets issus de la digestion ou fèces sont ensuite acheminés vers le rectum puis sont entraînés par les courants d'eau sortant du siphon exhalant. Outre sa fonction dans la digestion, la glande digestive peut également avoir un rôle d'organe de réserves pouvant être utilisées lors de la gamétogénèse mais également lors de stress physiologiques (Gosling, 2008). En tant qu'organe majeur dans la biotransformation, la glande digestive est aussi associée à une gamme très large d'activités enzymatiques.

Systeme reproducteur

La palourde japonaise est une espèce dioïque, capable de changer de sexe comme cela est observé chez l'huître : on parle alors d'hermaphrodisme asynchrone. Le système reproducteur est très simple, constitué gonades qui sont formées de nombreux tubules contenant les gamètes et se terminant par les gonoductes. La reproduction de la palourde étant externe, les gamètes sont ensuite expulsés via le siphon exhalant.

Systeme musculaire

La palourde possède deux muscles adducteurs, l'un situé en partie antérieure et l'autre en partie postérieure de l'animal. Ces muscles permettent la fermeture des valves lors de leur contraction et l'ouverture de celles-ci lors de leur relâchement.

De plus, en tant que bivalve fouisseur, la palourde dispose d'un large pied musculieux lui permettant de s'enfoncer dans le sédiment. Son enfouissement dans le substrat résulte de l'action coordonnée des muscles adducteurs et du muscle pédal (Trueman et al., 1966).

Système nerveux

Le système nerveux des bivalves est un système primitif constitué de trois paires de ganglions : les ganglions cérébroïdes (situés derrière l'œsophage), les ganglions pédieux (situés au niveau du pied) et les ganglions viscéraux (situés au niveau du muscle adducteur postérieur). À partir de chaque ganglion cérébroïde s'étendent deux paires de nerfs, la première vers les ganglions pédieux et la seconde vers les ganglions viscéraux (Gosling, 2008).

Système circulatoire

Le cœur de la palourde se situe au niveau dorsal de l'animal, près de sa charnière, et est délimité par le péricarde ou cavité péricardique. Il est constitué de deux oreillettes et d'un ventricule permettant la mise en mouvement de l'hémolymphe jusqu'à l'aorte antérieure (Gosling, 2008). Celle-ci se subdivise en de nombreuses artères, elles-mêmes se répartissant en un réseau de vaisseaux hémolympatiques irrigant tous les organes de l'animal. Le système circulatoire est dit « semi-ouvert » ou de type lacunaire puisque l'hémolymphe présente dans les sinus baigne directement les tissus de l'animal (Gosling, 2008).

Les hémocytes

Les hémocytes sont des cellules impliquées dans le transport, la digestion, la réparation des tissus ainsi que dans la défense immunitaire (Gosling, 2008). Deux grands types cellulaires d'hémocytes sont généralement retrouvés chez les bivalves : les granulocytes (10 à 20 μm , de forme variable, contenant de nombreux granules) et les agranulocytes ou hyalinocytes (4 à 6 μm , de forme ronde). Les granulocytes sont considérés comme étant le siège principal de la phagocytose (Cima et al., 2000). Ces cellules sont présentes dans l'hémolymphe de la palourde mais également dans les fluides extrapalléaux se situant entre la coquille de l'animal et son manteau (Allam and Paillard, 1998).

Le manteau : un organe impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques

Le manteau est composé de quatre bourrelets, le bourrelet interne, deux bourrelets médians et un bourrelet externe qui entourent complètement l'animal au sein de sa coquille et délimitent la cavité palléale (Paillard and Le Pennec, 1993). Les cils présents sur la surface du bourrelet interne permettent l'acheminement des particules vers les branchies et donc un premier tri de celles-ci selon leur taille (Paillard and Le Pennec, 1993; Gosling, 2008). Le bourrelet externe du manteau est à l'origine de sécrétions permettant la formation de coquille (Paillard and Le Pennec, 1993). Enfin, l'identification de gènes impliqués dans la réponse immunitaire ainsi que la surexpression d'une enzyme liée au système immunitaire inné (phénoloxydase) dans le manteau suite à une infection par *Vibrio tapetis* suggèrent que cet organe a également un rôle dans la défense immunitaire de la palourde (Jeffroy et al., 2013; Allam et al., 2014; Le Bris et al., 2015). A l'heure actuelle, aucune donnée ne permet de dire si ce sont les cellules épithéliales du manteau ou les hémocytes infiltrés dans ce tissu qui seraient à l'origine de la réponse immunitaire associée à cet organe.

1.2.3. Alimentation

Les mollusques bivalves sont des filtreurs et leur principale source de nourriture est le phytoplancton, même si d'autres sources peuvent être considérées comme les débris de matière organique, les bactéries qui y sont associées ainsi que la matière inorganique (Helm et al., 2004). Dans le cadre d'une production en aquaculture, les écloseries produisent des microalgues pour tous les stades de vie des bivalves présentant un intérêt commercial (Helm et al., 2004). Les principales espèces utilisées en aquaculture appartiennent aux familles des haptophycées (algues unicellulaires photosynthétiques flagellées) et des bacillariophycées ou diatomées (algues unicellulaires photosynthétiques possédant une structure externe siliceuse ou frustule). Parmi les haptophycées, les principales espèces produites en écloserie sont les suivantes : *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutherii*, *Tetraselmis suecica*. Concernant les diatomées, sont principalement cultivées les espèces suivantes : *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros gracilis*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*. Idéalement, un mélange entre ces deux familles dans la ration journalière des animaux est généralement plus bénéfique qu'une ration contenant seulement une seule espèce d'algue.

1.2.4. Reproduction et cycle de vie

La palourde japonaise est une espèce gonochorique protandre à fécondation externe. La maturité sexuelle de ces animaux est atteinte à l'âge de deux ans dans les zones tempérées. Comme chez de nombreuses espèces de bivalves, la gamétogénèse est contrôlée par deux facteurs environnementaux principaux, la température du milieu et l'apport trophique (Laruelle, 1999). En Europe, les palourdes japonaises entrent en gamétogénèse à partir de 8 °C en Irlande, de 10 °C dans le bassin d'Arcachon (France) et au-delà de 12 °C dans la rade de Brest (France) (Laruelle et al., 1994; Drummond et al., 2006; Dang et al., 2010). La gamétogénèse peut durer 2 à 5 mois selon les conditions environnementales et résulte en une ponte principale généralement observée en août ou en septembre (Laruelle, 1999). Cependant, des phénomènes de pontes partielles peuvent également avoir lieu dès le mois de mai jusqu'à la fin de l'automne (Gouletquer et al., 1989; Laruelle, 1999).

Le cycle de vie de *R. philippinarum* est dit méroplanctonique car les premières phases de sa vie, plus particulièrement la phase larvaire, ont lieu dans le plancton. Les gamètes sont expulsés en pleine eau où leur rencontre donnera lieu à la formation d'œufs fécondés (70 µm). Puis, 24 à 48h post-fécondation, les premières divisions embryonnaires ont lieu, le stade larve D ou larve trochophore est atteint pour une taille d'environ 100 µm (Calvez, 2003). Cette phase larvaire au sein du plancton peut durer 10 à 15 jours avant d'atteindre le stade larves véligères (200 µm) qui sont capables de nager dans le milieu grâce à leur velum (Calvez, 2003). Puis, lors de la métamorphose, le velum disparaît et les larves, pourvues d'un pied, sont alors identifiées comme des larves pédivéligères. C'est pendant cette phase que la glande digestive, les organes reproducteurs et la coquille se forment (Le Pennec, 1978). La métamorphose des larves véligères marque le passage d'une vie planctonique à une vie benthique puisque les larves vont sédimenter sur des fonds généralement sableux (Calvez, 2003).

2. Mécanismes de la réponse des invertébrés marins exposés à des stressseurs environnementaux

2.1. Qu'est-ce que le stress ?

2.1.1. De la notion d'homéostasie...

En 1878, le médecin et physiologiste Claude Bernard a défini deux milieux vitaux pour l'animal : le milieu extérieur et le milieu intérieur (Bernard et al., 1878). Le premier correspond au milieu dans lequel évolue l'organisme alors que le second est celui dans lequel vivent les tissus de l'animal. Selon le physiologiste, la vie de l'organisme ne se situe pas dans le milieu extérieur mais bien dans « *le milieu liquide intérieur formé par le liquide organique circulant qui entoure et où baignent tous les éléments anatomiques des tissus; c'est la lymphe ou le plasma, la partie liquide du sang [...]* ». C'est la fixité de ce milieu intérieur ou interne qui permet aux êtres vivants la vie libre et indépendante dans le milieu extérieur. Dans le cas de la palourde, nous pouvons considérer que l'hémolymphe constitue le milieu interne et les fluides extrapalléaux un milieu « pseudo-interne » étant donné qu'ils ne baignent pas tous les organes mais qu'ils sont toutefois présents dans l'animal entre sa coquille et son manteau.

En 1929, le terme d'homéostasie est créé par Walter B. Cannon qui en donne la définition suivante : « *Les êtres vivants supérieurs constituent un système ouvert doté de nombreuses relations avec son environnement [...] Des modifications de cet environnement induisent des réactions dans le système, voire l'affectent directement, aboutissant à des perturbations internes de ce système. De telles perturbations sont normalement maintenues dans des limites restreintes car des ajustements automatiques au sein du système entrent en action.* » (Cannon, 1929).

A cette définition, Cannon ajoute que ces ajustements automatiques résident dans les réactions physiologiques coordonnées du système et définit une classification des conditions homéostasiques *i.e.*, qui doivent être maintenues constantes dans l'animal (notamment l'eau, l'oxygène, la température et les nutriments).

2.1.2. ...A la notion de stress

Le concept de stress en médecine a été défini par l'endocrinologue Hans Selye comme étant la réponse non-spécifique du corps à toute demande. Plus précisément, le stress représente l'ensemble des réponses physiologiques qu'un animal met en place afin de maintenir ou de rétablir un métabolisme normal face à un stimulus environnemental appelé « *stresseur* » (Selye, 1950).

Bayne (1975) propose la définition suivante du stress adaptée aux bivalves marins : « *Le stress représente l'altération mesurable d'un état physiologique stable (comportemental, biochimique ou encore cytologique) qui est induite par une modification environnementale et rend les individus (ou la population) plus vulnérables aux futurs changements environnementaux* ».

Le stress constitue donc la conséquence d'un dérèglement de l'état physiologique stationnaire (homéostasie) et non la cause de celui-ci. La cause du stress est définie par l'agent stressant ou stresseur qui peut être de nature biotique (algues toxiques, infection, parasitisme...) ou abiotique (température, salinité, oxygénation, pH...).

2.2. Retour sur les réponses générales à des stressseurs chez les vertébrés et les invertébrés

2.2.1. Réponse aigüe : « Fight or Flight response »

Chez les vertébrés supérieurs, un premier type de réponse face à un stresseur réside dans le combat ou la fuite face à celui-ci (« *Fight or flight response* ») : c'est la réaction aigüe (Cannon, 1929). Cette réponse physiologique a été associée à une décharge générale d'hormones comme le cortisol ou encore de neurotransmetteurs comme la noradrénaline via l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et le système nerveux sympathique induisant chez l'animal la réaction de fuite ou de combat.

Chez les invertébrés, ces hormones et neurotransmetteurs ont été localisés dans l'hémolymphe et semblent remplir les mêmes rôles que chez les vertébrés (Ottaviani and Franceschi, 1996).

Plus particulièrement, chez le mollusque bivalve *Crassostrea gigas*, il a été démontré que la concentration en noradrénaline relarguée dans l'hémolymphe augmentait en cas de stress mécanique (Lacoste et al., 2001a).

2.2.2. Réponse d'adaptation : « Syndrome Général d'Adaptation »

2.2.2.1. Chez les vertébrés supérieurs

Le « syndrome général d'adaptation » (SGA) a été défini par 3 étapes distinctes chez l'humain (Figure 5) (Selye, 1950). La première est la phase d'alarme (PA) pendant laquelle l'organisme est « en alerte » et produit des catécholamines et du cortisol impliqués dans les processus anti-inflammatoires. Elle correspond à la réponse aiguë décrite ci-avant. Durant cette phase, la résistance de l'organisme face au stress est relativement faible et les modifications de l'homéostasie tendent à dépasser les limites normales. La libération d'hormones, de neurotransmetteurs et de cytokines durant cette phase induit la modulation des réponses immunitaires et métaboliques (Selye, 1946, 1952).

Puis, la seconde phase du SGA est la phase de résistance où les taux de catécholamines et de cortisol dans la circulation sanguine reviennent à la normale. Durant cette phase, la résistance de l'animal est élevée ; celui-ci mobilise ses ressources énergétiques dans la réponse immunitaire et métabolique pour permettre un retour à l'homéostasie. Cette phase peut être associée à l'apparition de dysfonctionnements dans l'organisme voire de maladies.

Enfin, le dernier stade ou stade d'épuisement (qui n'est pas obligatoire) apparaît lorsque les ressources énergétiques de l'animal s'épuisent, ne lui permettant donc plus d'assurer les fonctions immunitaires, métaboliques. La résistance de l'animal à cette phase décroît très rapidement, celui-ci s'affaiblit et son pronostic vital est en jeu.

La description de ces différentes phases du SGA est issue de travaux menés sur les vertébrés supérieurs (fig). Le mécanisme de cette réponse est étroitement lié aux systèmes nerveux et endocrinien caractérisés par la présence de cellules et d'organes spécifiques chez les vertébrés (neurones du système sympathique, hypothalamus, hypophyse, glande surrénale).

De la modulation de l'activité neuro-endocrine suite à l'exposition au stress, découlent les réponses immunitaires et métaboliques observées chez ces animaux.

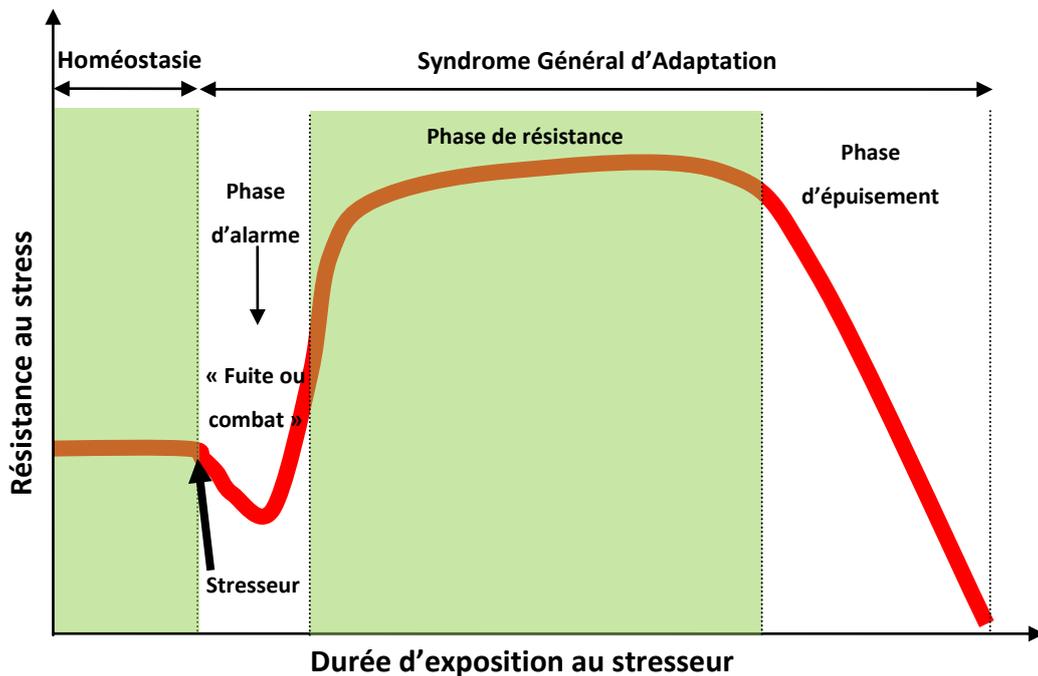


Figure 5 : Schéma représentant les différentes phases du Syndrome Général d'Adaptation chez les vertébrés (selon Selye, 1950).

2.2.2.2. Chez les invertébrés marins

2.2.2.2.1. Un SGA chez les invertébrés marins?

Chez les invertébrés, qui disposent de systèmes nerveux, endocriniens et immunitaires plus primitifs, quelques études ont mis en évidence une réponse générale au stress comparable à celle observée chez les vertébrés (Stefano et al., 1990; Ottaviani and Franceschi, 1996, 1998). La différence majeure avec le SGA des vertébrés réside dans le fait que cette réponse se concentre dans une unique cellule possédant des fonctions immunitaires et neuro-endocrines : l'hémocyte (Ottaviani and Franceschi, 1998).

2.2.2.2.2. La phase d'alarme

La plupart des études sur la réponse au stress menée sur des mollusques bivalves ont porté sur la première phase du SGA, correspondant à une réaction immédiate associée à la libération de médiateurs cellulaires impliqués à la fois dans le système immunitaire et neuro-endocrine (Gourdon et al., 1998; Ottaviani et al., 2007).

Présence de neurohormones

L'hémolymphe de la moule *Mytilus edulis* contient un pro-opiomelanocortine (POMC) similaire à celui des mammifères qui est un précurseur de substances neuroactives telles que l'hormone corticotrope (ACTH) et les catécholamines (Stefano et al., 1999). De plus, la stimulation immunitaire via l'exposition de l'hémolymphe de *M. edulis* à des lipopolysaccharides² (LPS) induit une production d'ACTH.

Présence de neuro-médiateurs

La présence de neuromédiateurs comme la noradrénaline (NA) et la dopamine (DA) a été rapportée dans l'hémolymphe et les ganglions nerveux de plusieurs bivalves (Paulet et al., 1993; Lacoste et al., 2001a; Aladaileh et al., 2008). De plus, leur sécrétion dans l'hémolymphe est induite suite à l'exposition à des stressseurs abiotiques comme l'agitation mécanique ou des modifications de la température et de la salinité (Lacoste et al., 2001a; Aladaileh et al., 2008). Ces résultats semblent indiquer que la voie de signalisation adrénergique est utilisée dans la réponse à des stressseurs (Lacoste et al., 2001a, 2001b, 2001c; Jiang et al., 2014).

Le monoxyde d'azote NO est un médiateur cellulaire impliqué dans les systèmes nerveux et immunitaire qui a fait l'objet de plusieurs études chez les mollusques bivalves. Le rôle de cette molécule en tant que neurotransmetteur a été mis en évidence chez *R. philippinarum* (Calabro et al., 2005) et chez le pétoncle *Chlamys farreri* (Kotsyuba, 2009). Par ailleurs, les hémocytes des bivalves sont capable de produire du NO *in vitro* en réponse à une stimulation immunitaire (Torreilles and Guerin, 1999; Arumugan et al., 2000; Jeffroy and Paillard, 2011; Tafalla et al., 2002).

Présence de cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines sécrétées suite à une stimulation et qui agissent à distance sur un grand nombre de cellules cibles afin d'en réguler l'activité. Différentes cytokines ont été identifiées chez les mollusques bivalves comme notamment le facteur de croissance transformant β (TGF- β), le facteur de nécrose tumorale (TNF) ou

² Les lipopolysaccharides sont des molécules associées aux parois des bactéries et sont généralement utilisés afin de provoquer une réponse immunitaire.

encore les interleukines (IL-1 α et β , IL-2). Par ailleurs, leur surexpression a été observée dans l'hémolymphe suite à une stimulation immunitaire (Raftos et al., 1991; Mydlarz et al., 2006; Ottaviani, 2006; Lelong et al., 2007; Lin et al., 2012; Zhang et al., 2013). De plus, une autre cytokine, le facteur-1 inflammatoire d'allogreffe (AIF-1) présent chez *C. gigas* est impliqué dans l'activation de la phagocytose des hémocytes et la réponse inflammatoire en induisant l'expression d'autres cytokines (IL-17, TNF) 6 à 24 h post-stimulation (Zhang et al., 2013).

L'hémocyte : le « cerveau mobile » de l'immunité chez les invertébrés ?

Finalement, toutes les molécules impliquées dans le SGA initialement décrit par Selye sont également produites lors de réactions inflammatoires et immunitaires chez les invertébrés grâce à leurs hémocytes. Ottaviani et al., (1993) émettent donc l'hypothèse que chez les invertébrés, la réponse générale au stress, similaire à celle des vertébrés, serait un type ancestral de réponse. Ainsi, par analogie au système neuro-endocrinien des vertébrés, l'hémocyte étant impliqué dans l'immunité, le stress et l'inflammation pourrait être vu comme un « cerveau mobile de l'immunité » (« Mobile Immune Brain ») chez les invertébrés. Par ailleurs, selon Ottaviani and Franceschi (1998) montrent que ces réponses, par ailleurs très conservées, sont profondément interconnectées (Figure 6).

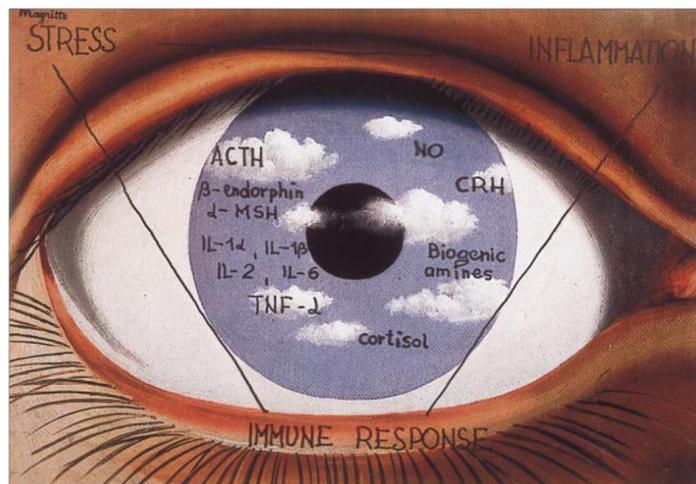


Figure 6 : L'hémocyte est le témoin d'une évolution commune entre la réponse au stress, la réponse inflammatoire et la réponse immunitaire – D'après Ottaviani & Franceschi (1998).

2.2.2.2.3. Relations entre la réponse générale au stress et la réponse immunitaire chez les invertébrés marins

L'action de catécholamines, comme la NA qui est la plus présente dans l'hémolymphe des mollusques bivalves et la DA, a été étudiée en lien avec les variables immunitaires des bivalves. Il a été montré que suite à l'exposition à un stresser, une augmentation de ces catécholamines dans l'hémolymphe induisait une baisse des variables immunitaires comme le taux de phagocytose, la production d'ERO, la concentration hémocytaire totale (CHT) de l'hémolymphe, des activités PO et phosphatases acides (PA) et des activités antioxydantes chez les invertébrés marins (Lacoste et al., 2001a, 2001b, 2001c, 2002; Cheng et al., 2005, 2006; Aladaileh et al., 2008; Zhou et al., 2011).

Ces études ont également montré que cette réponse était transitoire puisque l'immunodépression induite par l'augmentation des catécholamines ne dure en général qu'une 10^{aine} de minutes à une 10^{aine} d'heures suite à l'exposition au stresser (Lacoste et al., 2002; Aladaileh et al., 2008). Suite à cette période, les concentrations en NA et DA diminuent drastiquement alors que les variables immunitaires augmentent significativement (Lacoste et al., 2002; Aladaileh et al., 2008).

Par ailleurs, les travaux de (Lacoste et al., 2001a, 2001b, 2001c) ont montré que la modulation de la réponse immunitaire par les catécholamines impliquait la voie de signalisation des récepteurs β -adrénergiques chez *C. gigas*. De plus, une stimulation immunitaire des hémocytes de *C. farreri* par les LPS provoque l'augmentation simultanée de NO et de NA dans ces cellules (Jiang et al., 2014). Cette dernière étude a également mis en évidence l'implication des récepteurs α - et β -adrénergiques dans la production de NO. Enfin, il semblerait que la production de NO module en retour la production de NA dans les hémocytes de *C. farreri* mais le mécanisme de cette régulation reste inconnu à ce jour (Jiang et al., 2014).

2.3. La réponse immunitaire chez les invertébrés marins

Les défenses internes chez les invertébrés sont assurées par un système immunitaire capable d'identifier et d'éliminer les pathogènes efficacement au moyen de types cellulaires et de diverses molécules effectrices. Ce système ne peut fonctionner isolément puisqu'il

communique avec le système neuroendocrine afin de maintenir l'homéostasie (Pipe and Coles, 1995).

Contrairement au système immunitaire des vertébrés relevant à la fois de l'immunité innée et acquise, le système immunitaire des invertébrés est généralement considéré comme inné (Chu, 2000; Ellis et al., 2011), même si certaines études tendent à montrer qu'un phénomène de mémoire immunitaire existerait chez les invertébrés (Rowley and Powell, 2007). Ce système est intimement lié à leur « sang » ou hémolymphe, constituée d'une fraction cellulaire et d'une fraction liquide ou plasma. Cette compartimentation est associée à deux types de réponse immunitaire :

- Une réponse immunitaire à médiation cellulaire reposant notamment sur les processus de phagocytose et d'encapsulation effectués par les hémocytes ;
- Une réponse immunitaire à médiation humorale reposant sur les facteurs humoraux présents dans le plasma.

2.3.1. Réponse immunitaire à médiation cellulaire

Les hémocytes peuvent être classés en trois types cellulaires qui ont été déterminés chez les bivalves en fonction de leur morphologie et de leurs caractéristiques de coloration (Chu, 2000). Ainsi, on distingue globalement deux grands types, les cellules agranulaires ou hyalinocytes ne contenant pas ou peu de granules et les cellules granulaires contenant de nombreux granules (Cheng, 1975). Parmi les cellules granulaires, deux sous-types peuvent encore être distingués : les granulocytes et les fibrocytes (Cheng, 1975). De manière générale, on retrouve surtout les hyalinocytes et les granulocytes chez les différentes espèces de mollusques bivalves. La diversité de ces types cellulaires témoignerait des capacités de réponse différentielles entre eux (Allam and Raftos, 2015).

Les hémocytes remplissent les rôles immunitaires suivants : réparation de blessures, phagocytose, encapsulation d'éléments du non-soi, sécrétion d'enzymes, de cytokines et de facteurs humoraux (Pipe and Coles, 1995; F.-L. E. Chu, 2000; Ellis et al., 2011; Soudant et al., 2013).

Dans le cadre d'une réponse à un stresser biotique, les mécanismes cellulaires mis en place par les hémocytes de mollusques bivalves sont maintenant relativement bien

connus et consistent généralement en la phagocytose ou l'encapsulation du corps étranger (F.-L. E. Chu, 2000; Canesi et al., 2002; Soudant et al., 2013; Allam and Raftos, 2015).

Dans un premier temps, les hémocytes sont « recrutés » sur le site d'infection, ce phénomène est appelé « infiltration hémocytaire ». Il permet notamment la réparation des blessures occasionnées par un agent étranger par aggrégation des hémocytes *via* une connexion de leurs pseudopodes, conduisant à la formation d'un « bouchon » au niveau de la plaie (F.-L. E. Chu, 2000). Cette infiltration se traduit généralement par une diminution de la concentration hémocytaire totale (CHT) hémolympatique avant que les processus de phagocytose ou d'encapsulation aient lieu.

Les différentes étapes de la phagocytose (Figure 7) ont été décrites comme suit:

- (1) **Chimiotactisme** : attraction et migration des hémocytes vers un stimulus chimique provenant de l'agent du non-soi, comme les motifs moléculaires associés aux pathogènes (MMAPs) ;
- (2) **Reconnaissance et fixation** du corps étranger via des récepteurs membranaires de l'hémocyte comme les lectines ;
- (3) **Internalisation** du corps étranger suite à l'adhérence de celui-ci aux pseudopodes de l'hémocyte et une invagination de la surface formant une vésicule autour de celui-ci ou phagosome ;
- (4) **Dégradation** intra-cellulaire au sein du phagosome par les ERO mais également par les enzymes lysosomiales différant selon l'espèce de mollusque bivalve considérée.

Le processus d'encapsulation a lieu lorsque les corps étrangers sont de taille trop importante pour être phagocytés (Figure 7).

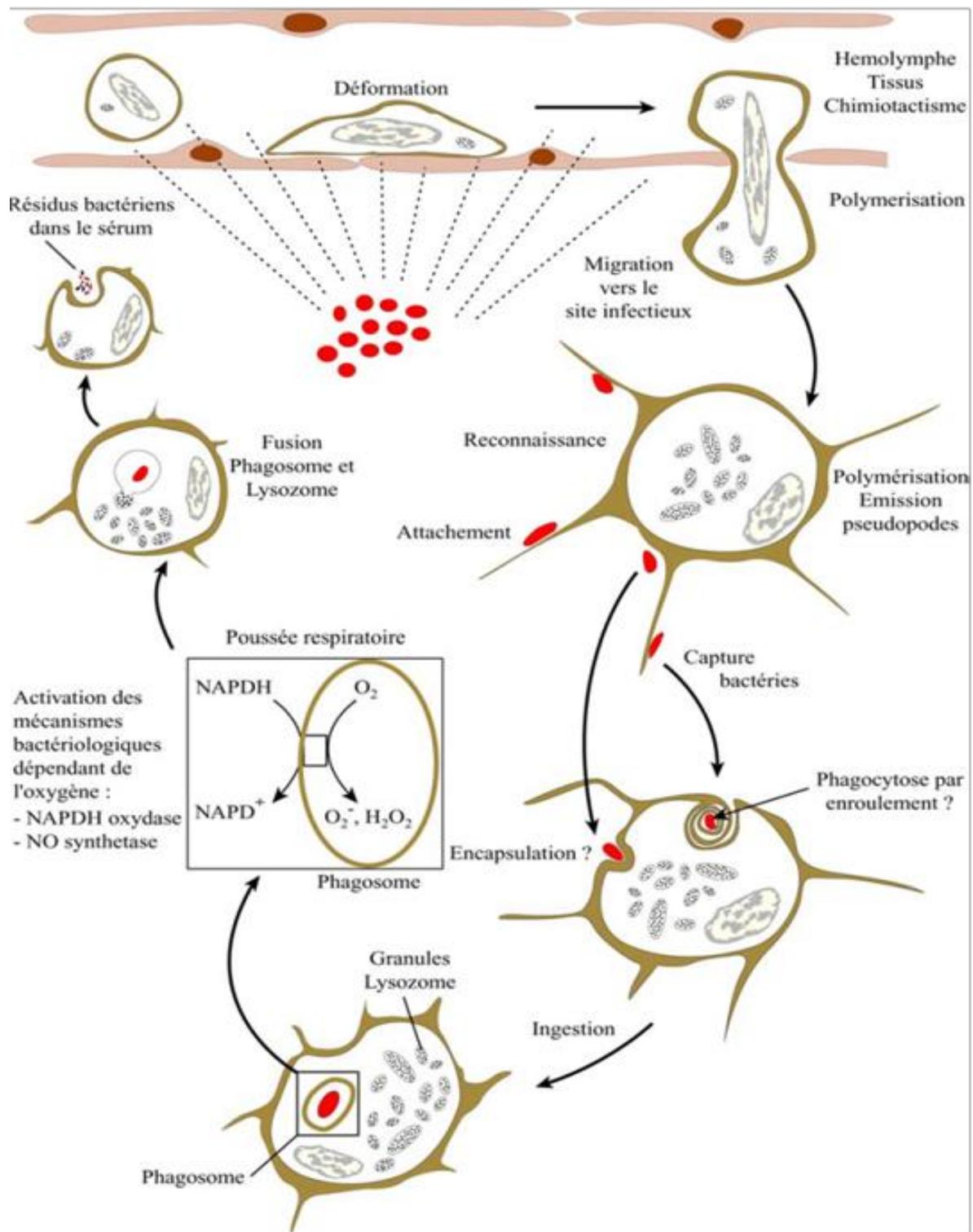


Figure 7 : Schéma récapitulatif des processus de phagocytose chez des cellules hémycytaires en contact avec des microorganismes (rouge) – D'après Paillard, 2004b.

L'encapsulation implique les phases de chimiotactisme, de reconnaissance et de fixation observées dans le cas de la phagocytose puis des hémocytes se différenciant en fibroblastes produisant une capsule de fibres entourant les corps étrangers (Wootton et al., 2006).

Le type de réponse cellulaire adopté par les invertébrés marins dans la défense contre les corps étrangers dépend énormément de la nature de ceux-ci. Mais il semblerait que, quel que soit ce type de réponse, les particules ou organismes encapsulés soient détruits par les enzymes lysosomiales et les ERO libérées par les hémocytes comme dans le cas de la phagocytose.

Dans le cas de palourdes japonaises infectées par *Perkinsus* spp., suite à l'étape de fixation, l'hémocyte se différencie en hémocyte sécréteur afin de créer une capsule à partir de polypeptides stockés dans les granules de la membrane de cet hémocyte (Montes et al., 1995a, 1995b; Soudant et al., 2013).

Chez *R. philippinarum*, il a été montré que les hémocytes étaient capables de phagocyter *V. tapetis* mais que celui-ci peut inhiber le processus de phagocytose (Lopez-Cortes et al., 1999; Allam and Ford, 2006). Par ailleurs, les activités LYS sont généralement augmentées dans les fluides extrapalléaux ou l'hémolymphe suite à l'exposition par *V. tapetis* suivant le lieu de l'infection (respectivement la cavité palléale, extrapalléale ou le muscle adducteur) (Allam et al., 2006).

2.3.2. Réponse à médiation humorale

La réponse immunitaire à médiation humorale est associée aux facteurs humoraux qui peuvent être liés à la réponse immunitaire à médiation cellulaire puisque certains d'entre eux sont produits et/ou stockés au sein des hémocytes avant d'être libérés dans le plasma lors d'une exposition à un stresser.

2.3.2.1. Reconnaissance du non-soi par les récepteurs de reconnaissance des pathogènes – RRP

Les RRP sont des récepteurs cytoplasmiques, membranaires ou solubles dans le plasma reconnaissant les motifs moléculaires associés aux pathogènes (MAMPs) (Allam and Raftos, 2015). Ces motifs sont par exemple les lipopolysaccharides et les peptidoglycane des parois cellulaires bactériennes, les β -1,3-glucanes d'origine fongique, les flagelles, les lipoprotéines bactériennes ou encore de l'ADN bactérien (Janeway, 1989).

Parmi les RRP associés aux membranes, les récepteurs Toll-like ou TLRs (« Toll-like receptors ») ont été identifiés chez les huîtres *C. gigas* et *C. virginica* ainsi que chez la palourde *Mercenaria mercenaria* (Tanguy et al., 2004; Perrigault et al., 2009).

Les protéines de reconnaissance des peptidoglycane ou PGRP (« peptidoglycans-recognition proteins ») font également partie des RRP. Chez *C. gigas*, une PGRP a été identifiée et serait aussi caractérisée par une activité bactériolytique (Itoh and Takahashi, 2009).

Les lectines sont des RRP qui peuvent être soit membranaires, soit solubles dans le plasma des bivalves ; certaines d'entre elles ont été identifiées chez *R. philippinarum* (Bulgakov et al., 2004; Kang et al., 2006; Kim et al., 2008b). Les lectines ne sont pas uniquement impliquées dans la reconnaissance des MAMPs mais également dans les processus d'opsonisation et d'agglutination (Soudant et al., 2013; Allam and Raftos, 2015).

2.3.2.1. Neutralisation de l'agent pathogène

Enzymes hydrolytiques

Le lysozyme (LYS) est l'enzyme hydrolytique qui lyse les liaisons glycosidiques des peptidoglycane des parois des bactéries, ce qui lui confère son activité bactéricide (Olsen et al., 2003). L'activité de la LYS est également associée aux processus de digestion chez ces animaux comme cela a été montré chez *C. virginica* (Xue et al., 2004, 2007).

Les phosphatases acides (PA), participant également à la dégradation des protéines, glucides et lipides étrangers, sont retrouvées chez les mollusques bivalves (Wootton and Pipe, 2003; Cong et al., 2008; Wang et al., 2015).

La leucine amino-peptidase (LAP), une exopeptidase, fait partie des enzymes hydrolytiques retrouvées dans l'hémolymphe des mollusques (Cheng et al., 1978; Oubella et al., 1994).

Peptides antimicrobiens – PAMs

Chez les mollusques bivalves, les premiers PAMs ont été isolés chez *M. edulis* et *M. galloprovincialis* (Mitta et al., 1999a, 1999b). Plus précisément, des PAMs riches en cystéine, les défensines, mytilines, myticines, ont été trouvés dans les hémocytes de *M. galloprovincialis* (Mitta et al., 1999a, 1999b).

Ces PAMs sont localisés dans les granulocytes des bivalves et sont impliqués dans la destruction des bactéries au sein des hémocytes avant d'être déversés dans l'hémolymphe participant ainsi à une réponse systémique (Mitta et al., 1999b, 2000a, 2000b).

Chez *R. philippinarum*, plusieurs PAMs ont été identifiés dont notamment une grande défensine (VpBD) dans les hémocytes (Zhao et al., 2010; Jeffroy et al., 2013) et dans le manteau (Jeffroy et al., 2013) mais aussi d'un PAM de type défensin (MCdef) dans différents tissus de la palourde (Adhya et al., 2012).

Inhibiteurs de protéases

Les inhibiteurs de protéases comprennent notamment les inhibiteurs de protéases à sérines (serpines), les inhibiteurs de protéases à cystéine et les inhibiteurs de métalloprotéases (Allam and Raftos, 2015). Ces inhibiteurs assureraient la protection de l'hôte contre les protéases des microorganismes en limitant leur prolifération et leur croissance (Soudant et al., 2013; Allam and Raftos, 2015). De plus, ils participent également à la protection de l'hôte contre ses propres activités protéases pouvant mener à la formation de composés toxiques (Cerenius and Söderhäll, 2004). La présence d'inhibiteurs de protéases a été mise en évidence dans le plasma de *C. virginica* et *C. gigas*, ils inhibent notamment les serpines produites par le parasite *Perkinsus marinus* (Faisal et al., 1998).

Chez la palourde japonaise, une serpine a été identifiée et son expression a été rapportée dans le manteau d'animaux infectés par *V. tapetis* (Jeffroy et al., 2013).

Les phénoloxydases – PO

Les PO sont des oxydoréductases catalysant l'oxydation de composés phénoliques en quinones, en présence de dioxygène. Trois sous-classes de PO peuvent être distinguées comme suit (Figure 8) :

- Les tyrosinases (EC 1.14.18.1) qui oxydent les monophénols (activité crésolase) et les o-diphénols (activité catécholase) ;
- Les catécholoxydases (EC 1.10.3.1) qui oxydent uniquement les o-diphénols (activité catécholase) ;
- Les laccases (EC 1.10.3.2) qui oxydent les o-diphénols (activité catécholase) et les p-diphénols (activité laccase).

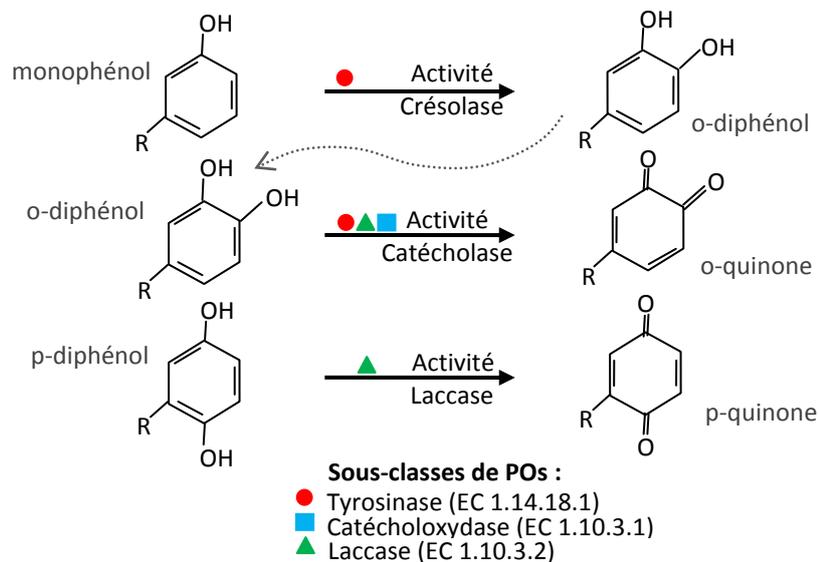


Figure 8 : Sous-classes de PO et activités associées, modifié d'après Walker and Ferrar (1998).

Le système des PO et d'activation de la PO ont été largement décrits chez les invertébrés et particulièrement chez l'écrevisse *Pacifastus leniusculus* (Cerenius and Söderhäll, 2004). Les PO existent sous une forme inactive, ou zymogène, appelée proPO qui est produite et stockée dans les granules des hémocytes. L'activation de la proPO est concomitante avec d'autres réponses immunitaires telles que les activités antimicrobiennes, cytotoxiques, opsoniques. La reconnaissance des MMAPs par les RRP dans l'hémolymphe des invertébrés est mise en place suite à l'entrée de microorganismes dans le corps ou

encore suite à des blessures occasionnées par des microorganismes (Cerenius and Söderhäll, 2004).

Le processus de reconnaissance induit l'activation de la cascade réactionnelle de protéases à sérine mais également l'exocytose des zymogènes de la ppA (« pro-phenoloxidase activating enzyme ») et de la pPO (« pro-phenoloxidase ») (Söderhäll and Cerenius, 1998). Dans un premier temps, les protéases à sérines vont activer la pro-ppA ou zymogène de la ppA. Puis, dans un second temps, l'activation de la pPO ou zymogène de la PO sera effectuée par la ppA et, selon les cas, avec l'intervention complémentaire de protéases à sérine (Cerenius and Söderhäll, 2004).

Les produits des PO sont les quinones, des composés extrêmement toxiques impliqués dans la lutte contre les agents bactériens ou encore fongiques.

Ainsi, les étapes d'activation associées aux activités PO sont sous contrôle d'inhibiteurs de protéases, les serpinines, afin d'éviter la production non-nécessaire de composés toxiques (Cerenius and Söderhäll, 2004).

Par ailleurs, les PO catalysent les premières étapes conduisant à la formation de la mélanine, une molécule impliquée dans diverses fonctions biologiques (Soderhall et al., 1990; Cerenius and Söderhäll, 2004). En effet, le processus de mélanisation est notamment associé à :

- la **défense immunitaire** en permettant de circonscrire l'infection par le phénomène d'encapsulation mélanotique, en soignant les blessures et en produisant des molécules limitant la croissance du pathogène (Nappi et al., 2009) ;
- la **photoprotection** grâce aux propriétés d'absorption de la mélanine et particulièrement des quinones dans le spectre de la lumière visible mais également dans l'ultra-violet (UV) ou encore l'infra-rouge (IR) (Riley, 1997);
- la **sclérotinisation** chez les insectes via l'incorporation de quinones aux protéines de leur cuticule (Andersen, 2010);
- la **chémoprotection** notamment via le piégeage des ERO ou encore des métaux toxiques (Riley, 1997).

Chez les mollusques, les PO ont d'abord été caractérisées dans l'hémolymphe des huîtres *C. gigas* et *S. glomerata* (Aladaileh et al., 2007; Hellio et al., 2007; Luna-Acosta et al., 2011). La PO caractérisée chez *C. gigas* par Luna-Acosta et al. (2010) présentait des activités catécholase et laccase, il s'agirait ainsi d'une PO de type laccase. De plus, il a été montré chez *C. gigas* que le système PO des hémocytes présentait une activité antibactérienne face à des vibrions (Luna-Acosta et al., 2011). Chez l'huître *Saccostrea glomerata*, il a été montré que la résistance au pathogène *Marteilia sydneyi* pouvait être caractérisée par une augmentation de l'activité PO en association au processus de phagocytose chez les individus exposés (Butt and Raftos, 2008; Kuchel et al., 2010).

La caractérisation du système PO chez *R. philippinarum* et sa modulation suite à l'infection par *V. tapetis* ont fait l'objet de précédents travaux au sein du LEMAR (Le Bris, 2013).

La principale PO présente dans l'hémolymphe de *R. philippinarum* est de type laccase même s'il a également été montré qu'une faible part des activités PO était de type tyrosinase (Le Bris et al., 2013).

2.3.3. Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

2.3.3.1. Sources et production basale des ERO et des ERA

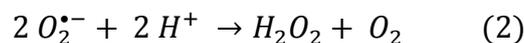
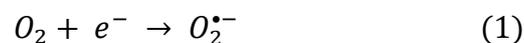
Production d'ERO liée aux transferts d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les mitochondries sont les organites permettant aux cellules de produire de l'énergie via la formation d'adénosine tri-phosphate (ATP) lors de la respiration cellulaire. Les transferts conjoints d'électrons au sein de la matrice mitochondriale et de protons (H^+) vers celle-ci sont effectués par les différents complexes enzymatiques et protéines de la membrane mitochondriale. Ces transferts permettent de créer et maintenir une différence de potentiel (ou gradient) électrochimique membranaire. Celle-ci est caractérisée d'une part, par une différence de potentiel (ou gradient) électronique membranaire $\Delta\psi_m$ et, d'autre part, par le gradient de protons, Δp_H , qui est alors utilisé par l'ATP synthase pour phosphoryler l'adénosine di-phosphate (ADP) en ATP.

En conditions physiologiques normales, i.e. en conditions homéostatiques, l'organisme produit naturellement des espèces réactives de l'oxygène ou ERO via la chaîne

respiratoire mitochondriale (Boveris et al., 1972). Les ERO peuvent être non radicalaires comme les peroxydes (ROOH) ou radicalaires comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) ou le radical hydroxyl (HO^{\bullet}). Ces radicaux libres peuvent être définis comme des molécules ou fragments moléculaires ayant un ou plusieurs électrons non appariés au niveau de leurs orbitales atomique ou moléculaires (Halliwell et al., 1999). Ces électrons non appariés confèrent aux ERO un haut degré de réactivité pouvant occasionner de nombreux dommages cellulaires, notamment au niveau des lipides membranaires, de l'ADN, des protéines mais également des glucides (Hermes-Lima, 2004). Des études sur les mollusques bivalves ont mis en évidence une production basale des ERO chez des animaux non exposés à des stressseurs (Lambert et al., 2003; Bugge et al., 2007; Lambert et al., 2007b; Donaghy et al., 2012). Notamment, chez *C. gigas*, il a été montré que les ERO, notamment l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, dans les hémocytes étaient produits par la mitochondrie au cours de la respiration et non par la NADPH oxydase, la NOS ou la myelopéroxydase cytoplasmique (Donaghy et al., 2012).

Finalement, les principales ERO produites dans la mitochondrie sont l' $O_2^{\bullet-}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . De plus, l'anion superoxyde est une molécule instable, très réactif et incapable de diffuser à travers les membranes (Manduzio et al., 2005). Chez les vertébrés supérieurs, il a d'ailleurs été montré que le transport d' $O_2^{\bullet-}$ à travers la membrane mitochondriale était effectué par une porine, appelée canal anionique voltage dépendant VDAC (« voltage-dependant anion channel ») (Han et al., 2003). Cependant, la majorité des $O_2^{\bullet-}$ sont produits dans la mitochondrie par oxydation de l' O_2 suite à la fuite des électrons selon la réaction (1). L'anion superoxyde va en fait subir la réaction de dismutation (2) aboutissant à la formation de H_2O_2 .



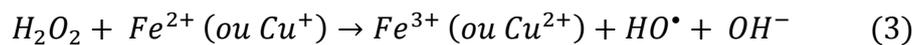
Cette réaction peut avoir lieu spontanément au sein de la matrice mitochondriale mais peut également être accélérée par voie catalytique avec la superoxyde dismutase mitochondriale (Mn-SOD) (Fridovich, 1975). Ainsi, ces voies enzymatiques³ et non-

³ Les voies enzymatiques et non-enzymatiques de dégradation du H_2O_2 seront évoquées dans la section 2.3.3.2. Prise en charge des ERO et ERA.

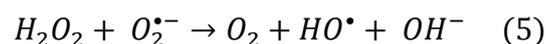
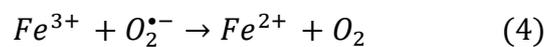
enzymatiques permettent de maintenir une concentration mitochondriale en $O_2^{\bullet-}$ relativement basse (100 – 200 pM) (Boveris and Cadenas, 2000).

Le peroxyde d'hydrogène, un ERO moins réactif et plus stable que l' $O_2^{\bullet-}$ mais capable de diffuser au travers des membranes cellulaires est décomposé par des voies enzymatiques et non-enzymatiques (Hermes-Lima, 2004). Ces voies assurent le maintien de concentrations cytosoliques en H_2O_2 plutôt faibles (1 – 10 nM) qui restent tout de même plus élevées que les concentrations cytosoliques en $O_2^{\bullet-}$ (10 – 100 pM) (Hermes-Lima, 2004). Cependant, les concentrations en H_2O_2 peuvent être bien plus élevées au sein de la matrice mitochondriale (Boveris et al., 1972).

Parmi les voies de dégradation du peroxyde d'hydrogène, la réaction de Fenton (3) aboutit à la production d'une autre ERO, le radical hydroxyl HO^{\bullet} (Hermes-Lima, 2004).



De plus, lorsque $O_2^{\bullet-}$ est présent dans le milieu, il peut agir comme un réducteur de l'ion Fe^{3+} (4) et la combinaison avec la réaction (3) donne lieu à la réaction plus générale (5) connue sous le nom de réaction d'Haber-Weiss (Valko et al., 2007).



Le radical hydroxyl est considéré comme une des ERO les plus réactives, avec une faible durée de vie en réagissant près de son site de formation (Hermes-Lima, 2004; Valko et al., 2007).

Production d'ERO liée à la détoxification dans le réticulum endoplasmique et le peroxysome

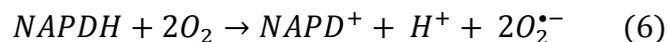
Chez les vertébrés, le réticulum endoplasmique contient plusieurs cytochromes regroupés sous le nom de cytochrome P-450 (CYP) qui sont associés à la détoxification de xénobiotiques et potentiellement à la formation d'ERO comme $O_2^{\bullet-}$ (Manduzio et al., 2005). Chez les mollusques bivalves, quelques études ont identifié des gènes correspondant au CYP

ainsi que des variations dans leur expression mais leur activité enzymatique n'a jamais été démontrée (Donaghy et al., 2015).

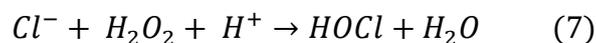
De plus, les peroxysomes sont également le siège d'activités consommatrices en oxygène et par définition de production des ERO tels que H₂O₂. Toutefois, peu d'études ont directement démontré le rôle des peroxysomes dans la production des ERO chez les bivalves marins (Donaghy et al., 2015).

Production d'ERO liée aux membranes cellulaires

Les membranes cellulaires et vésiculaires des vertébrés contiennent des enzymes capables de produire intra- ou extra-cellulairement une ERO en particulier, l'O₂^{•-}, en oxydant le dioxygène : les NADPH oxydases ou NOX. Ces NOX catalysent la réduction de O₂ en lui transférant un électron provenant de l'oxydation concomitante du NADPH selon la réaction (6). Si l'existence de telles enzymes a été montrée chez *C. gigas* (Zhang et al., 2012), leur caractérisation d'un point de vue biochimique reste à faire chez les bivalves.



Chez les mammifères, la myéloperoxydase est une enzyme qui produit l'acide hypochlorique (HOCl), une espèce particulièrement réactive, à partir du H₂O₂ selon la réaction (7). Cette enzyme est associée aux granules cytoplasmiques lorsque l'organisme n'est soumis à aucune stimulation. Une enzyme homologue présentant la même activité, la péroxinectine (PXN), a été caractérisée à la surface des hémocytes du crustacé *P. leniusculus* (Johansson et al., 1999; Holmblad and Söderhäll, 1999; Lin et al., 2007).

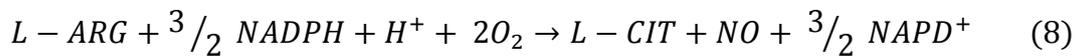


Enfin, une autre source de production des ERO provient du processus de dégradation des lipides membranaires, ou peroxydation lipidique, par les ERO cités précédemment (Hermes-Lima, 2004).

Production des ERA

Il est généralement admis que les espèces réactives de l'azote (ERA) sont produites à partir du NO formé via l'activité de la NOS (Donaghy et al., 2015). Cette enzyme est une oxydo-réductase catalysant la formation de L-citrulline (L-CIT) à partir de L-arginine (L-ARG)

selon la réaction (8). La production de L-CIT est accompagnée de celle du NO, une espèce réactive de l'azote impliquée dans des fonctions neuro-hormonales mais également immunitaires.



Trois isoformes de la NOS ont été caractérisées chez les vertébrés supérieurs : la NOS neuronale (nNOS ou NOS-1) constitutive retrouvée dans les tissus neuronaux, la NOS inductible (iNOS ou NOS-2) retrouvée dans divers types cellulaires et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS-3) initialement retrouvée dans les cellules vasculaires endothéliales (Knowles and Moncada, 1994; Alderton et al., 2001; Bogdan, 2001). Chez les invertébrés, des NOS constitutives ont été caractérisées dans le tissu neuronal et des NOS inductibles au niveau des cellules immunitaires de ces animaux (Colasanti and Venturini, 1998).

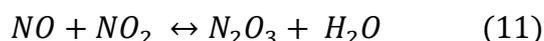
Les NOS ont été d'abord identifiées par des méthodes d'histochimie chez les mollusques bivalves. **A titre d'exemple, une nNOS a été localisée par immunohistochimie dans le manteau et le pied de *R. philippinarum* (Calabro et al., 2005). Par ailleurs, la production de NO par la NOS a été mise en évidence dans l'hémolymphe et les hémocytes des palourdes *R. decussatus* et *R. philippinarum*, chez l'huître *C. gigas* et chez la moule *M. galloprovincialis* sans stimulation préalable** (Tafalla et al., 2002; Novas et al., 2004; Lambert et al., 2007b; Novas et al., 2007; Jeffroy and Paillard, 2011).

Outre la formation de NO, une autre ERA particulièrement réactive peut être formée en présence d' $O_2^{\bullet -}$ selon la réaction (9) : l'anion peroxy-nitrite $ONOO^-$. Chez *M. galloprovincialis*, la production de cette ERA a pu être constatée dans hémocytes stimulés *in vitro* préalablement (Torreilles and Guerin, 1999).



Enfin, d'autres ERA peuvent être produites suite à la dégradation de NO comme le dioxyde d'azote (NO_2) selon la réaction (10) et le trioxyde dinitrogène (N_2O_3) selon les réactions (10) qui ont des propriétés oxydantes et nitrosantes importantes (Beckman and Koppenol, 1996).

Enfin, ces espèces peuvent ensuite conduire à la formation de nitrites (NO_2^-), un produit stable de la décomposition de NO à la suite des réactions (10), (11) et (12).



De plus, l'anion ONOO^- en changeant de conformation peut être détoxifié en nitrate (NO_3^-), une ERA plus stable comme présenté par la Figure 9.

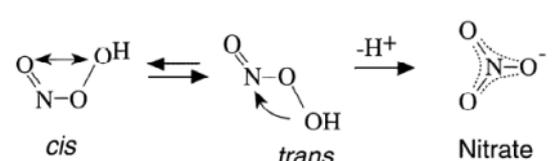
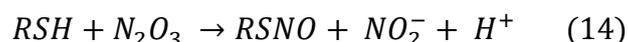
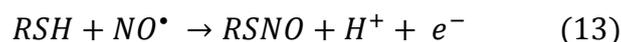


Figure 9 : Le changement de conformation cis à trans de l'anion ONOO^- permet la production d'une forme plus stable, le nitrate (NO_3^-) – D'après Beckman & Koppenol, 1996.

Enfin, la réaction de nitrosylation ou nitrosation (13), (14) et (15) implique les ERA précédemment formées qui réagissent avec les groupements phénoliques, les groupements thiols des amines au sein des protéines ou des amines libres (notés RSH) mais également avec l'ADN (Beckman and Koppenol, 1996; Hausladen et al., 1998). Les nouvelles ERA alors formées comprennent notamment les nitrosothiols (RSNO) comme décrit par les réactions (13), (14) et (15).



Il a été démontré qu'un RSNO, le 3-nitrotyrosine, était formé dans le plasma de *M. galloprovincialis* et *C. gigas* sans stimulation préalable (Torreilles and Romestand, 2001). De plus, cette étude a également montré que la production de 3-nitrotyrosine était consécutive à celle de NO par la NOS grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de celle-ci, le L-NIO.

De la même manière que les ERO provoquent de nombreux dommages cellulaires, les ERA peuvent entraîner des altérations des protéines, de l'ADN mais également des lipides (Beckman and Koppenol, 1996; Hausladen et al., 1998; Hermes-Lima, 2004).

2.3.3.1. Surproduction des ERO et ERA

Chez l'humain, un évènement métabolique impliquant la surproduction d'ERO a été décrit dans les cellules phagocytaires: il s'agit de la flambée respiratoire ou oxydative, « respiratory/oxidative burst » (Valko et al., 2007). En effet, la phagocytose est accompagnée d'une augmentation de la consommation en O₂ stimulant ainsi l'activité de la NADPH oxydase. Ce phénomène se poursuit naturellement par la production de métabolites de l'O₂ comme O₂^{•-}, H₂O₂, HO[•], HO⁻ mais également par une surproduction des ERA. Ces espèces réactives, cytotoxiques sont produites et s'accumulent dans les milieux intra- et extra-cellulaires pour agir comme de véritables agents-tueurs envers les corps étrangers.

Cependant, chez les mollusques bivalves, si une augmentation de la production des ERO est observée, des précautions doivent être prises quant à l'emploi du terme « flambée respiratoire ou oxydative ». En effet, la surproduction des ERO chez les vertébrés peut atteindre 1000 à 1500 fois la production basale en quelques dizaines de secondes alors qu'elle atteint seulement 2 à 10 fois cette production basale en dizaines de minutes chez les bivalves (Donaghy et al., 2009, 2015). La surproduction d'ERO et d'ERN, par rapport à un niveau basal (sans stimulation) a été observée chez de nombreux bivalves suite à une stimulation environnementale, biotique ou abiotique⁴ (Donaghy et al., 2015).

2.3.3.2. Prise en charge des ERO et ERA

La surproduction et l'accumulation des ERO et des ERA dans les compartiments intra- et extra- cellulaires peut engendrer des altérations au niveau des protéines, des lipides, des glucides mais également des acides nucléiques chez les bivalves (Beckman and Koppenol, 1996; Hermes-Lima, 2004; Lesser, 2006). Une mise en place rapide de défenses adaptées chez ces animaux est donc nécessaire afin de détoxifier ces ERO et ERA avant apparition de dommages cellulaires irréversibles (Manduzio et al., 2003; Monari et al., 2005; Letendre et al., 2008). La prise en charge de ces espèces réactives est assurée par le système antioxydant qui se décline en deux parties, l'une est enzymatique et l'autre est non-enzymatique.

⁴ Les effets de stressseurs biotiques et/ou abiotiques sur la production d'ERO et d'ERA seront plus amplement développés dans la section « Modulation de la réponse immunitaire par l'environnement »

Les enzymes antioxydantes

Ces enzymes fonctionnent en cascade réactionnelle produisant une ERO de moins en moins réactive à chaque réaction pour l'enzyme suivante.

La première ERO formée en condition d'homéostasie ou en réponse à un stimulus environnemental est O_2^- . Cette molécule sera transformée en H_2O_2 par la SOD selon la réaction de dismutation (2) décrite précédemment. Différentes isoformes de la SOD ont été décrites chez les vertébrés et les invertébrés : la SOD 1 ou Cu/Zn-SOD qui est cytoplasmique, la SOD 2 ou Mn-SOD qui est mitochondriale et la SOD 3 ou EC-SOD qui est extracellulaire (Manduzio et al., 2003; Monari et al., 2005; Letendre et al., 2008).

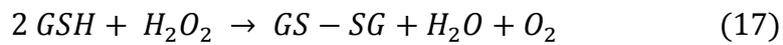
Par ailleurs, les gènes codant pour la Cu/Zn-SOD intracellulaire et la Mn-SOD mitochondriale ont été identifiées chez *R. philippinarum*, et leur activité antioxydante a été confirmée (Li et al., 2010; Umasuthan et al., 2012a). Concernant la EC-SOD, des tentatives de purification et de caractérisation ont été effectuées chez plusieurs bivalves mais jamais l'activité SOD n'a pu être associée aux protéines purifiées. Chez la palourde *C. gallina*, des analyses sur gels immunoblot ont confirmé la présence et l'activité des SOD intra- et extracellulaires (Monari et al., 2005).

Suite à la formation de H_2O_2 par la SOD, plusieurs enzymes sont amenées à détoxifier cette nouvelle ERO : la catalase (CAT), les glutathion peroxydases (GPxs) et les thiorédoxine peroxydases (TrxPs) (Rhee et al., 2005). Ces enzymes ont des rôles complémentaires selon leur localisation et la concentration en peroxydes dans le milieu (Rhee et al., 2005; Pamplona and Costantini, 2011).

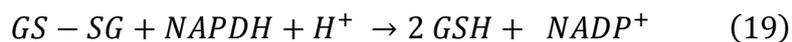
La catalase est une protéine à hème tétramérique qui transforme H_2O_2 en eau et en dioxygène selon la réaction (16) (Aebi, 1984). Cette enzyme agit dans les peroxyosomes des cellules et à de fortes concentrations en H_2O_2 (Rhee et al., 2005; Pamplona and Costantini, 2011). **Elle a notamment été caractérisée chez la palourde *Meretrix meretrix* et l'augmentation de son expression a été associée à une exposition à H_2O_2 (Wang et al., 2013).**



Les GPxs sont des protéines tétramériques présentes dans le cytosol et les mitochondries des cellules mais peuvent être extracellulaires également (Ursini et al., 1985). Par ailleurs, il existe deux types de GPx, les GPx sélénium dépendantes (Se-GPx) et non-sélénium dépendantes (NonSe-GPx) (Hermès-Lima, 2004). Ces enzymes catalysent la décomposition du peroxyde d'hydrogène ainsi que de nombreux peroxydes organiques via l'oxydation du glutathion selon les réactions (17) et (18) (Hermès-Lima, 2004). Les GPxs sont moins efficaces dans la dégradation de H₂O₂ que la CAT mais présentent une meilleure affinité pour ce substrat. **Il a été montré que l'activité de la Se-GPx et de la GPx totale étaient diminuées chez la palourde japonaise suite à une exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (Barreira et al., 2007).**



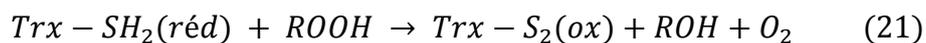
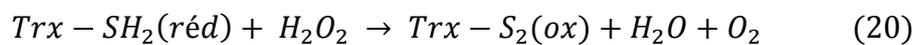
Le fonctionnement des GPxs est intimement relié à l'activité de l'enzyme auxiliaire qu'est la glutathion réductase (GR). En effet, cette enzyme permet de réduire le glutathion sous sa forme oxydée (GSSG) en glutathion réduit (GSH) selon la réaction (19) (Hermès-Lima, 2004). Elle permet donc de fournir le co-substrat de la GPx mais également de participer au maintien de l'homéostasie redox cellulaire via la production de GSH (Winston and Digiulio, 1991; Hermès-Lima, 2004).



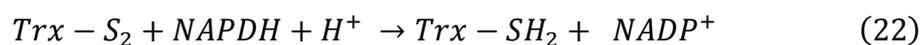
La thiorédoxine (Trx) est une petite protéine de 12 kDa caractérisée par la présence de deux résidus cystéine lui conférant des propriétés oxydoréductrices (Rhee et al., 2005). Les principaux rôles de cette enzyme sont : (1) l'apport d'électrons nécessaire aux cycles catalytiques d'autres enzymes et (2) la protection de protéines cytosoliques contre leur agrégation ou leur inactivation en formant des ponts disulfides intra- ou inter-moléculaires (Arner and Holmgren, 2000). Ces enzymes assurent également un rôle très important dans l'homéostasie des thiols dans la cellule (Powis and Montfort, 2001). **Par ailleurs, chez *R. philippinarum*, deux Trx ont été identifiées et caractérisées : Trx-1, cytosolique et Trx-2, mitochondriale** (Revathy et al., 2012b; Umasuthan et al., 2012c).

Les TrxPs sont des protéines homodimériques catalysant et jouant un rôle similaire à celui des GPxs (Rhee et al., 2005). En effet, ces enzymes catalysent la transformation de H₂O₂ mais également de peroxydes organiques en eau, alcools et dioxygène via l'oxydation de la Trx selon les réactions (20) et (21). Chez l'humain, 6 isoformes de la TrxP sont présentes dans les cellule : les TrxP-I, II et VI qui sont mitochondriales, les TrxP-III et V qui sont peroxysomales et la TrxP-IV qui est extracellulaire (Rhee et al., 2005). Chez l'ormeau *Haliotis discus discus*, la dégradation de H₂O₂ par deux isoformes de TrxP (TrxP-1 et TrxP -2) a été mise en évidence (Pushpamali et al., 2008).

Chez *R. philippinarum*, un gène codant pour la TrxP a été identifié et son expression est diminuée suit à une exposition à un phtalate (Lu et al., 2013).



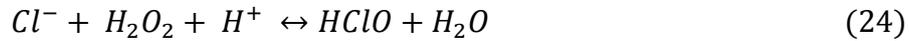
L'activité des TrxPs est également à mettre en relation avec celle d'une autre enzyme auxiliaire : la thioredoxine réductase (TrxR). Cette enzyme permet de réduire la Trx sous sa forme oxydée (Trx-SH₂) en Trx réduit (Trx-S₂) selon la réaction (22) (Arnér and Holmgren, 2000). Jusqu'à présent, deux isoformes de cette enzyme sont connues chez les vertébrés : la TrxR-1 cytosolique et la TrxR-2 mitochondriale.



La glutathion peroxydase (GST) est une enzyme de phase II de la détoxification des xénobiotiques, i.e. cette enzyme permet de modifier la solubilité du composé à éliminer pour sa future excrétion (Sheehan et al., 2001). Les GST sont des transférases qui réalisent la réaction de conjugaison du glutathion sous sa forme réduite (GSH) avec des substrats xénobiotiques divers (R-X) et notamment les lipides peroxydés selon la réaction (23). **Les GST sont présentes dans le cytosol des cellules, dans leurs mitochondries et diverses isoformes ont pu être identifiées et caractérisées chez *R. philippinarum* (Revathy et al., 2012a; Umasuthan et al., 2012b).**



Enfin, chez les vertébrés, une autre enzyme, la myéloperoxydase (MPO) est impliquée dans la détoxification de H_2O_2 , pour cette fois former une ERO plus toxique, l'acide hypochloreux (HClO) selon la réaction (24).



Il semble qu'une MPO-like existe chez les invertébrés marins, il s'agit de la péroxinectine (PXN), une protéine associée à la surface des hémocytes chez *P. leniusculus* impliquée dans l'opsonisation et la production de HClO (Holmblad and Söderhäll, 1999; Johansson et al., 1999; Lin et al., 2007). Par ailleurs, il semblerait que la PXN soit excrétée dans les mêmes circonstances que la PO et utiliserait le même système d'activation (PPAE) que cette enzyme lorsqu'elle est sous forme de zymogène dans les granules des hémocytes (Figure 10) (Lin et al., 2007). Enfin, un gène codant pour la PXN a été identifiée chez *C. gigas* et son expression semble être modulée selon la résistance au stress thermique chez ces individus (Lang et al., 2009). **A ce jour, une telle enzyme n'a pas été caractérisée chez les mollusques bivalves mais des activités de type myéloperoxydase ont pu être quantifiées chez le pétoncle *C. farreri* (Lin et al., 2011).**

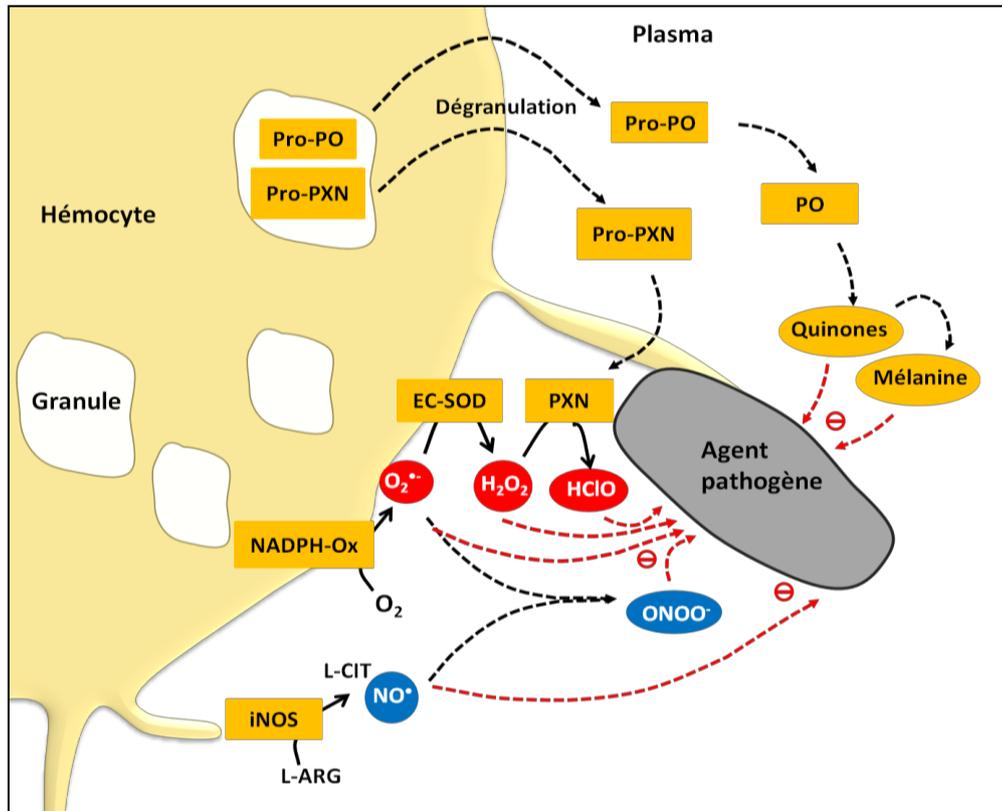


Figure 10 : Schéma récapitulatif des défenses humorales antioxydantes mises en place chez les crustacés lors d'une exposition à un agent pathogène – modifié d'après Holmblad & Söderhall, 1999.

Abréviations : NADPH-Ox, NADPH oxydase; EC-SOD, superoxyde dismutase extracellulaire ; Pro-PO, pro-phénoloxydase ; Pro-PXN, pro-peroxinectine ; PO, phénoloxydase ; PXN, peroxinectine.

Les antioxydants (non enzymatiques)

La plupart des défenses antioxydantes non-enzymatiques ne sont pas synthétisées de façon endogène par les animaux mais sont fournies via la nourriture (Hermes-Lima, 2004). Parmi les antioxydants endogènes, on retrouve notamment des métabolites de faible poids moléculaire comme le glutathion et ses analogues, l'acide ascorbique, la mélanine ou encore l'acide urique. Le glutathion peut réagir directement sur $O_2^{\bullet-}$ et HO^{\bullet} sans intervention enzymatique et comme co-substrat de diverses enzymes antioxydantes comme les GPxs, la GR et les GST précédemment évoqué (Lesser, 2006). L'acide ascorbique prend en charge les ERO telles que $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 et HO^{\bullet} ainsi que les lipides peroxydés. Parmi les antioxydants fournis par les apports nutritionnels, la vitamine E, les caroténoïdes et les polyphénols

assurent un rôle de protection notamment par rapport à la peroxydation des lipides (Hermes-Lima, 2004).

La prise en charge des ERA : implication du système antioxydant ?

De nombreuses études ont montré que les ERA étaient prises en charge par les systèmes antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques. Par exemple, chez les vertébrés, il semblerait que la résistance des macrophages au NO et aux RSNO implique l' $O_2^{\bullet-}$, les métallothionéines (MTs) ou encore les HSP (Sies, 1997). De plus, les anions $ONOO^-$ peuvent être décomposés très rapidement par la Se-GPx mais également de la Trx et la TrxP selon le mécanisme présenté en Figure 11 (Sies et al., 1997; Hermes-Lima, 2004). C'est la présence des résidus cystéines dans les Se-GPx et les TrxR qui leur confèrent la capacité de réduire l'anion $ONOO^-$. Pour que cette réaction se fasse, il est nécessaire que les résidus CYS de ces deux enzymes soient à l'état réduit ($GPx-Se^- + H^+$; $TrxP^- + H^+$) afin que $ONOO^-$ puisse les oxyder par une attaque nucléophile et ainsi former ONO^- (Dubuisson et al., 2004). Il y a alors formation d'une nouvelle forme oxydée de ces enzymes, $GPx-SeOH$ et $TrxP-OH$, puis formation d'un pont disulfide intramoléculaire ($GPx-Se-S_2$; $TrxP-S_2$). Ces dernières formes peuvent ensuite retourner à un état réduit grâce à l'oxydation de GSH et de Trx(réd).

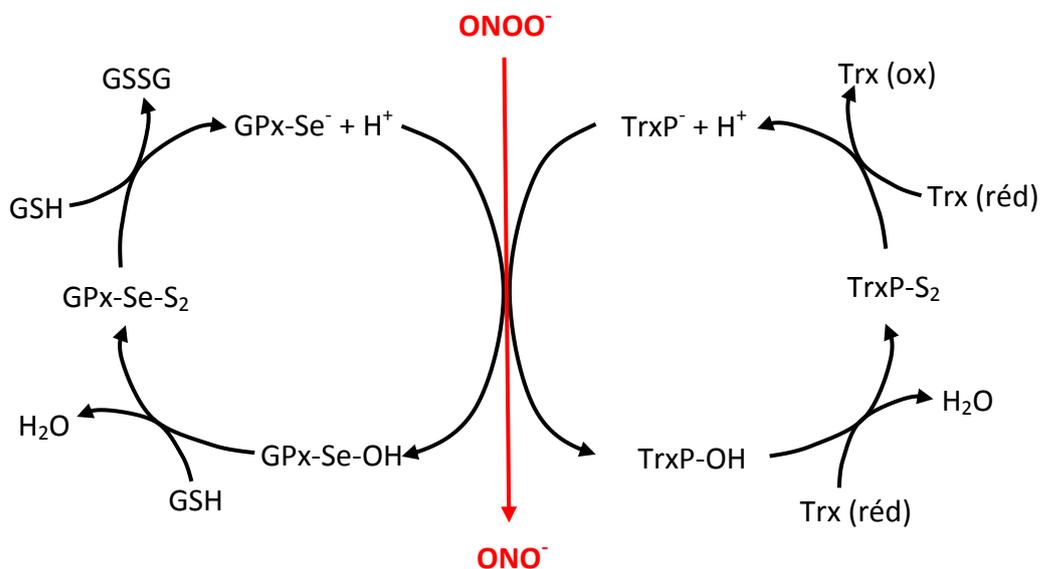


Figure 11 : Mécanisme de détoxification de l'anion $ONOO^-$ en nitrite NO_2^- par l'intervention de la Se-GPx – modifié d'après Sies et al., 1997 et Dubuisson et al., 2004.

Abréviations : Se-GPX, glutathion peroxidase selenium dépendante ; TrxP, thioredoxine peroxidase ; Trx, thioredoxine ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé.

Enfin, les RSNO décrites précédemment peuvent permettre la capture du NO et donc limiter l'accumulation de cette ERA et les potentiels dommages associés (Hausladen et al., 1998; Hermes-Lima, 2004). Notamment, le S-nitroso-glutathion (GSNO) permet de contrer la formation de l'anion ONOO^- (Hermes-Lima, 2004). Cependant, étant donné le rôle du glutathion dans le maintien de l'homéostasie redox cellulaire, cette capture de NO rend le glutathion moins disponible pour remplir son rôle de tampon redox. De plus, il a également été montré que la formation de GSNO occasionnait une inhibition de l'activité des enzymes associées au glutathion comme les GPx, la GR et les GST (Asahi et al., 1995). Ces inhibitions peuvent par conséquent entraîner également l'accumulation des ERO qui ne sont plus prises en charge par les GPx, GR et GST.

Finalement, les produits finaux de dégradation des ERA sont les ions nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-) qui sont des molécules très stables.

Un schéma récapitulatif hypothétique des voies de production et de prise en charge des principales ERO et ERA chez les mollusques bivalves est proposé en Figure 12.

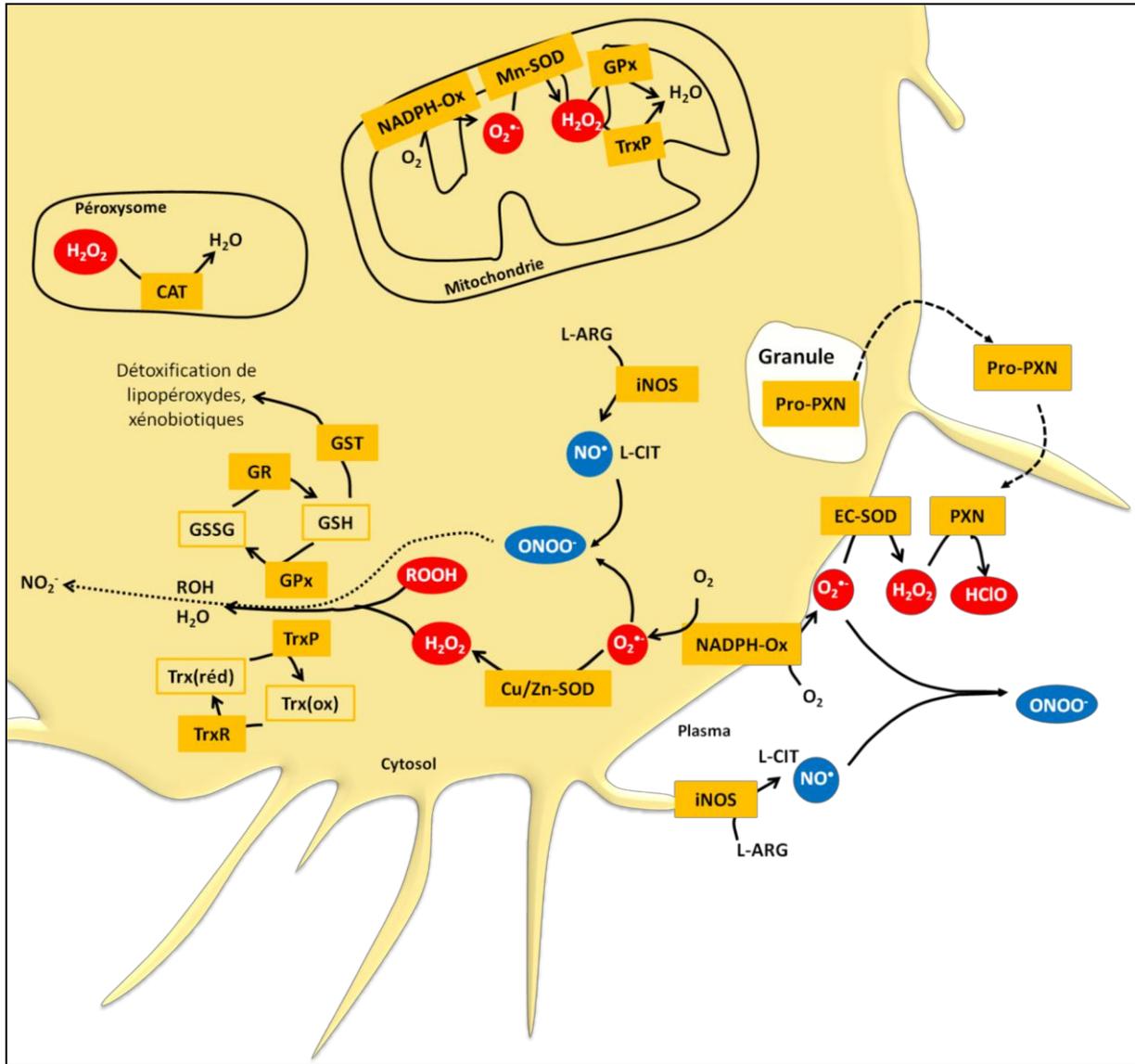


Figure 12 : Schéma hypothétique des principales voies de production et de prise en charge des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote chez les mollusques bivalves.

Abréviations : NADPH-Ox, NADPH oxydase ; Mn-SOD, Mn-superoxyde dismutase ; Cu/Zn-SOD, Cu/Zn-superoxyde dismutase ; GPx, glutathion peroxydase ; TrxP, thioredoxine peroxydase ; CAT, catalase ; GR, glutathion réductase ; GST, glutathion-S-transférase ; TrxR, thioredoxine réductase ; iNOS, oxyde nitrique synthase ; EC-SOD, superoxyde dismutase extracellulaire ; PXN, peroxinectine.

2.3.3.3. Les stress oxydatif et nitrosatif

Définition des stress oxydatif et nitrosatif

Les stress oxydatif et nitrosatifs sont respectivement définis par un déséquilibre entre d'une part, la production des ERO et des ERA et, d'autre part, la prise en charge de ces espèces réactives (Hausladen et al., 1998; Hermes-Lima, 2004; Lesser, 2006). Ainsi, une compensation de la surproduction des ERO et ERA par les systèmes de dégradation de ces espèces réactive est associée à une réponse physiologique de l'animal qui est le **maintien ou le retour à l'homéostasie redox**. Dans le cas contraire, une accumulation des ERO et ERA dans les milieux intra- et extra-cellulaires occasionnant de nombreux dommages est caractérisée par une réponse physiologique de l'animal qui est le **stress oxydatif ou nitrosatif** (Figure 13).

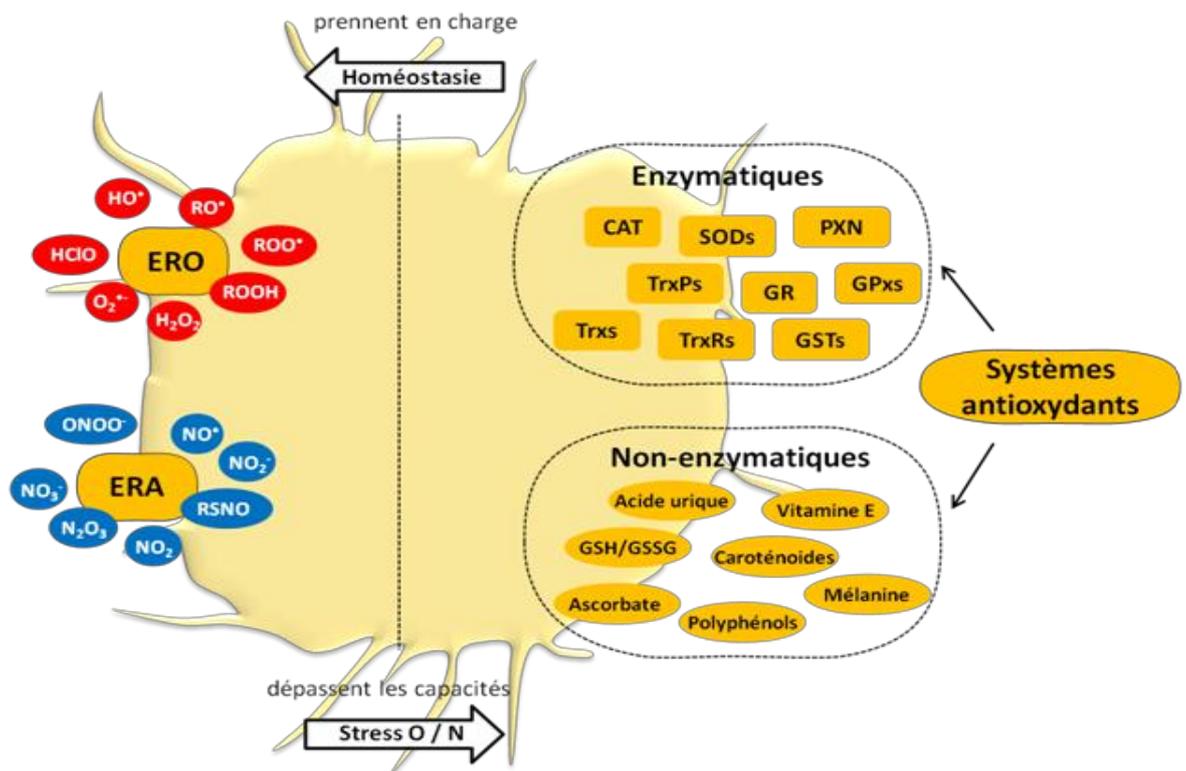


Figure 13 : Schéma illustrant les relations entre la production d'espèces réactives et leur prise en charge.

Abréviations : SOD, superoxyde dismutase ; GPx, glutathion peroxydase ; TrxP, thioredoxine peroxydase ; CAT, catalase ; GR, glutathion réductase ; GST, glutathion-S-transférase ; TrxR, thioredoxine réductase ; Trx, thioredoxine ; PXN, peroxinectine ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé ; Stress O/N, stress oxydatif / nitrosatif ; ERO, espèces réactives de l'oxygène ; ERA, espèces réactives de l'azote.

Relations entre les stress oxydatif et nitrosatif

Dans les sections précédentes nous avons vu qu'il existait des liens entre les ERO et les ERA puisque celles-ci peuvent avoir des propriétés oxydantes. De plus, lorsqu'ils ne sont pas pris en charge, les ERA et les ERO agissent généralement sur les mêmes cibles : protéines, lipides, ADN (Hausladen et al., 1998; Lesser, 2006; Sheehan and McDonagh, 2008).

Une surproduction d'ERA peut conduire à la diminution d'antioxydants comme le glutathion (par la formation de GSNO) et donc induire un stress oxydatif. Inversement, une surproduction d'ERO (notamment O_2^-) peut mener à la production d'espèces nitrosantes comme l'anion $ONOO^-$, ce qui peut avoir pour conséquence un stress nitrosatif.

Cependant, si le changement du statut redox est une condition *sine qua non* pour la mise en place du stress oxydatif, ce n'est pas un pré-requis pour le stress nitrosatif (Hausladen and Stamler, 1999). De ce fait, la connexion entre les stress oxydatif et nitrosatif n'est pas une nécessité.

2.4. Modulation de la réponse immunitaire par l'environnement

2.4.1. Effet de stressseurs biotiques

Agents pathogènes

Les réponses immunitaires cellulaires et humorales sont particulièrement dépendantes des facteurs environnementaux (Soudant et al., 2004) mais également de l'espèce de bivalve et de l'agent pathogène considérés (Soudant et al., 2013). Ainsi, l'augmentation du taux de phagocytose ou d'autres variables hémoctaires suite à une infection n'est pas nécessairement observée, notamment si l'agent pathogène met en place des mécanismes d'évitement de la phagocytose ou s'il produit des substances cytotoxiques (Canesi et al., 2002). Dans le cadre de vibrioses comme celle de *R. philippinarum* causée par *V. tapetis* ou celle de *C. gigas* causée par *V. aestuarianus*, il a été montré que les capacités phagocytaires, les propriétés d'adhésion des hémocytes étaient négativement impactées chez les animaux infectés (Choquet et al., 2003; Choquet, 2004; Labreuche et al., 2006).

Une des premières réponses immunitaires mises en place suite à l'attaque d'un agent pathogène réside dans leur reconnaissance par l'organisme. Ainsi, chez différents bivalves, il est généralement observé une surexpression des gènes codant pour les TLRs, les lectines ou encore des PGRPs suite à une exposition à des agents pathogènes (Tanguy et al., 2004; Kim et al., 2008b; Itoh and Takahashi, 2009; Perrigault et al., 2009).

Par ailleurs, l'augmentation de la production des ERA *in vitro* dans l'hémolymphe ou les hémocytes a été constatée chez *C. gigas*, *R. decussatus*, *R. philippinarum*, *M. edulis* et *M. galloprovincialis* suite à une exposition à des stressseurs biotiques (Franchini et al., 1995; Torreilles and Guerin, 1999; Gourdon et al., 2001; Tafalla et al., 2002; Villamil et al., 2007; Jeffroy and Paillard, 2011). Enfin, l'augmentation conjointe des ERO et du NO a été observée dans l'hémolymphe de la moule *M. galloprovincialis* injectée soit par *Micrococcus lysodeikticus* soit par *V. anguillarum* (Costa et al., 2009).

Au sein des mécanismes de défense humorale, il a été montré que les activités d'enzymes hydrolytiques (LYS, LAP, PA) étaient généralement augmentées suite à infection bactérienne chez les bivalves que ce soit dans l'hémolymphe ou dans les fluides extrapalléaux chez *R. philippinarum* (Oubella et al., 1994; Allam and Paillard, 1998; Allam et al., 2000b, 2000a; Cong et al., 2008; Wang et al., 2015). De plus, l'intervention de PAM a été suggérée dans le cadre de l'infection de *R. philippinarum* par *V. tapetis* et résulterait en la surexpression de gènes codant pour des défensines chez les individus infectés (Jeffroy et al., 2013; Allam et al., 2014).

De plus, l'exposition à *V. tapetis* induit la surexpression de certains transcrits correspondants à des serpins dans les fluides extrapalléaux et le manteau de la palourde japonaise (Allam et al., 2014). Chez *C. virginica*, des inhibiteurs de protéases à sérine (serpins) ont été purifiés et sont associés à une inhibition *in vitro* de la prolifération du pathogène *P. marinus* (Xue et al., 2006, 2009; J. F. La Peyre et al., 2010).

Le système des POs a été associé à des réponses de résistance de l'hôte face aux infections. Par exemple, l'inhibition de l'activité PO dans l'hémolymphe de l'huître *S. glomerata* faciliterait l'infection parasitaire par *Marteilia sydneyi* (Peters and Raftos, 2003). Suite à cette découverte, un programme de sélection d'huîtres résistantes à cette infection a été mis en place. Finalement, la résistance de ces huîtres face à *M. sydneyi* a été caractérisée par une augmentation de l'activité PO en association au processus de phagocytose chez les individus exposés (Butt and Raftos, 2008; Kuchel et al., 2010). En effet, l'encapsulation mélanotique de *M. sydneyi* a été observée dans les hémocytes de *S. glomerata* après phagocytose des parasites (Figure 14).

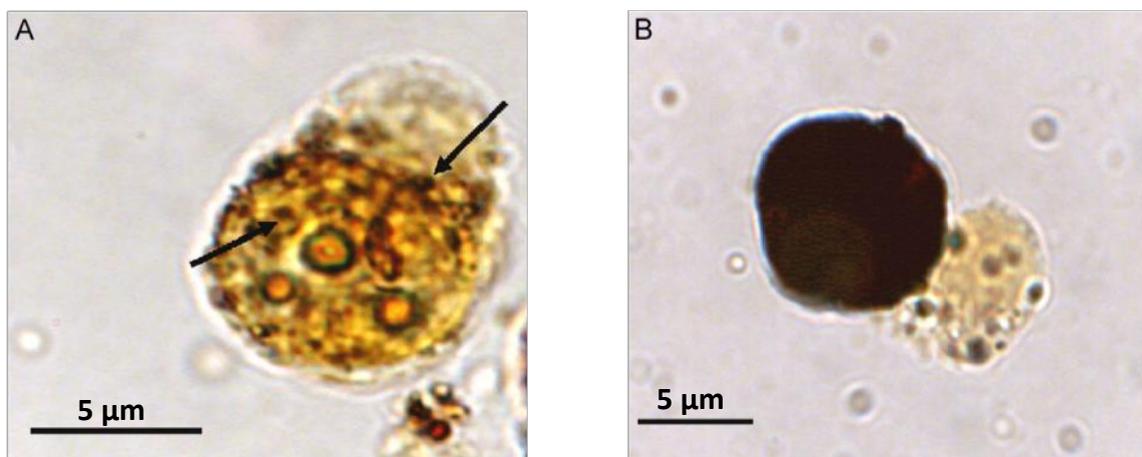


Figure 14 : A. Phagocytose de *M. sydneyi* par un granulocyte de *S. glomerata* et début de mélanisation autour des parasites (indiquée par les flèches) et B. L'encapsulation mélanotique est presque achevée, le granulocyte et les parasites phagocytés sont presque entièrement mélanisés – D'après Butt & Raftos, 2008.

L'activation de la PO a également été observée suite à l'exposition *in vitro* de l'hémolymphe de *C. gigas* à différents vibriens et suite à l'exposition *in vivo* de *R. philippinarum* à *V. tapetis* et permettrait de restreindre la dissémination de ces pathogènes (Luna-Acosta et al., 2011; Le Bris et al., 2015).

Microalgues

La modification du régime algal en termes de qualité et quantité chez les mollusques bivalves est aussi susceptible de conduire à des modifications immunitaires comme la surproduction des ERO. Cela a notamment été observé dans les hémocytes de *R. philippinarum* et de *C. gigas* lorsque ces animaux sont nourris avec la micro-algue *Chaetoceros calcitrans* plutôt qu'avec *T-Iso*, et dans les granulocytes de *C. gigas* nourries

avec *Skeletonema costatum* plutôt qu'avec *Tetraselmis chui* (Delaporte et al., 2003; Hégaret et al., 2004). Par ailleurs, Delaporte et al., (2003) ont montré que les palourdes nourries avec *C. calcitrans* présentaient des capacités phagocytaires et une CHT augmentées par rapport aux animaux nourris avec T-Iso.

L'absence de la ressource trophique dans le milieu induit une immuno-dépression chez l'huitre *S. glomerata*, notamment marquée par la chute des activités PO, PA et peroxydases ainsi que par la production d'anion superoxyde et la CHT (Butt and Raftos, 2008).

Plusieurs études ont également montré que l'exposition de palourdes à la microalgue toxique *Prorocentrum minimum*, provoquait de profondes modifications de leurs paramètres hémostatiques comme une diminution de la taille des hémocytes et du taux de phagocytose chez *R. philippinarum* et une baisse de la phagocytose associée à une augmentation de la production d'ERO dans les hémocytes de *M. mercenaria* (Hégaret et al., 2009, 2010). Par ailleurs, l'exposition de *R. philippinarum* à *Alexandrium ostenfeldii* a été associée à l'augmentation de la taille des hémocytes ainsi qu'une baisse de l'activité SOD dans les branchies des animaux (Lassudrie et al., 2014).

2.4.2. Effet de stressseurs abiotiques

Oxygénation du milieu

L'exposition de la palourde *Chamelea gallina* à un milieu anoxique provoque une baisse générale des paramètres hémostatiques suivants: CHT, du taux de phagocytose, des capacités d'adhésion des hémocytes ainsi que des activités PA et SOD (Pampanin et al., 2002; Matozzo et al., 2005; Monari et al., 2005). Par ailleurs, ces études ont également montré une diminution de l'activité LYS et une surexpression de l'activité EC-SOD dans le plasma de ces palourdes suite à un stress anoxique.

Un milieu hypoxique entraîne chez les bivalves une surproduction des ERO, au moins au tout début de l'hypoxie, ce qui se traduit par l'augmentation de l'expression de gènes codant pour des enzymes antioxydantes chez *C. gigas* (Sussarellu et al., 2010). Cependant, le lien entre production d'ERO et l'hypoxie n'est pas encore totalement élucidé chez les bivalves puisqu'il a également été montré chez *C. virginica* que l'exposition à un milieu

hypoxique induisait une baisse d'environ 30 % de la production des ERO par rapport aux conditions normoxiques (Boyd and Burnett, 1999).

Température du milieu

L'augmentation de la température du milieu induit généralement une augmentation du compte d'hémocytes totaux, une diminution de la taille des hémocytes, du taux de phagocytose chez *C. gallina* et *C. farreri* (Chen et al., 2007; Monari et al., 2007). Au contraire, une diminution de la température semble ne pas avoir d'impact sur les variables hémocytaires chez *C. farreri* (Chen et al., 2007).

Une surproduction des ERO a également été observée chez les bivalves suite à une augmentation brutale de la température du milieu (Abele et al., 2002; Hégaret et al., 2003; Heise et al., 2003). En effet, chez les espèces d'invertébrés marins vivant dans des habitats sédimentaires faiblement oxygénés, une augmentation de la température peut mener à l'hypoxie des tissus conduisant alors à une surproduction d'ERO durant la ré-oxygénation (Abele and Puntarulo, 2004).

Les réponses humorales sont aussi affectées par l'augmentation de la température. En effet, l'activité LYS dans le plasma de *C. gallina* est diminuée sous l'effet de la hausse de température alors qu'une surexpression de l'activité EC-SOD est observée (Monari et al., 2007).

L'augmentation des activités antioxydantes (SOD et CAT) suite à une augmentation de la température a également été observée chez la mye *Mya arenaria* (Abele et al., 2002). Cette activation des enzymes SOD et CAT a été associée à une surproduction d'ERO et n'a pas occasionné de dommages oxydatifs. Par ailleurs, Abele and Puntarulo (2004) émettent l'hypothèse d'une température limite au-dessus de laquelle les enzymes antioxydantes sont activées et d'une température critique à partir de laquelle une dénaturation de ces enzymes provoque leur incapacité à détoxifier les ERO induisant ainsi un stress oxydatif chez l'animal.

Salinité du milieu

La diminution de la salinité (de 34 à 28‰) du milieu induit chez *C. gallina* une augmentation de la taille et du volume cellulaire des hémocytes alors qu'en milieu hypersalin (40 ‰), la CHT est diminuée chez cet animal (Matozzo et al., 2007). Par ailleurs,

les activités Mn-SOD et Cu/Zn-SOD dans les hémocytes de *C. gallina* sont diminuées en milieu hypersalin alors qu'une surexpression de la EC-SOD semble être associée à l'augmentation de la salinité (Monari et al., 2007). En outre, il a été montré chez *S. glomerata* que l'activité PO dans l'hémolymphe était positivement corrélée à la salinité (Butt et al., 2006).

Acidification du milieu

Une exposition prolongée de la moule *M. edulis* à un pH acide induit une diminution du taux de phagocytose dans les hémocytes (Bibby et al., 2008). Par ailleurs, chez la palourde *C. gallina* et la moule *M. galloprovincialis*, il a été observé qu'une exposition à de faibles pH (7.4) en même temps qu'à de fortes températures (28 °C) du milieu, induisait chez ces animaux une chute de la CHT et altérait également les fonctionnalités des hémocytes (Matozzo et al., 2012). Enfin, ces mêmes conditions de pH et de température induisent une augmentation des activités SOD et CAT dans les branchies et les glandes digestives de *C. gallina* et *M. edulis* mais une augmentation de la peroxydation lipidique indiquant donc un état de stress oxydatif chez ces animaux (Matozzo et al., 2013).

Présence de contaminants

Chez les bivalves, la modulation des variables liées à la réponse immunitaire telles que les activités PO, PA, la CHT ou encore le taux de phagocytose suite à une exposition à des stressseurs chimiques est particulièrement dépendante du type de stressseur chimique étudié. Ainsi, l'exposition de *S. glomerata* à un anesthésiant ($MgCl_2$) aura tendance à induire une augmentation de ces variables (Butt et al., 2008). Par contre, une exposition à des pesticides comme le diuron et l'isoproturon résultera plutôt en une diminution drastique de ces variables chez *C. gigas* (Gagnaire et al., 2007; Luna-Acosta et al., 2012).

Par ailleurs, une grande partie des études menées sur la prise en charge des ERO par les systèmes antioxydants ont porté sur des expositions de bivalves à des polluants tels que les ions métalliques, les contaminants comme les HAPs ou les PCBs (Manduzio et al., 2005). Cependant, de même que pour les variables immunitaires précédemment évoquées, une grande variabilité dans la réponse de ces systèmes est observée dépendant de la nature du contaminant mais également du bivalve considéré (Nasci et al., 2000; Geret et al., 2002;

Manduzio et al., 2003, 2004; Barreira et al., 2007; Letendre et al., 2008; Epelboin et al., 2015).

2.4.3. Effet couplé des stressseurs biotiques et abiotiques

Température et agent pathogène

Chez les palourdes *R. philippinarum* et *M. mercenaria*, il a été montré que l'élévation de la température du milieu induisait une activation de LAP dans l'hémolymphe et l'augmentation des variables hémostatiques telles que la CHT, le pourcentage de granulocytes, le taux de phagocytose ainsi que la production d'ERO (Paillard et al., 2004a; Perrigault et al., 2011). Cette meilleure condition immunitaire de *R. philippinarum* et *M. mercenaria* a été associée à une meilleure défense face à *V. tapetis* et au parasite QPX respectivement, se traduisant par de plus faibles prévalences et intensités de ces infections aux hautes températures (Paillard et al., 2004a; Dahl et al., 2011; Perrigault et al., 2011).

Par ailleurs, l'augmentation de la température du milieu induit également une amélioration générale des paramètres immunitaires de l'huître *C. virginica* (Chu and Lapeyre, 1993). Cette amélioration des défenses chez l'huître aux hautes températures n'a cependant pas résulté en de plus faibles intensités d'infection par *P. marinus*. En effet, les huitres les plus infectées étaient celles acclimatées aux faibles températures. Ainsi, d'autres paramètres tels que la viabilité, la prolifération, la virulence ou encore l'activité métabolique de *P. marinus* qui sont influencés par la température pourraient expliquer la faible intensité d'infection aux températures basses (Chu et al., 2003; La Peyre et al., 2010; Soudant et al., 2013).

Une immunodépression marquée par la baisse du taux de phagocytose et de l'activité PO chez les ormeaux *Haliotis diversicolor supertexta* et *Haliotis tuberculata* a été associée à l'augmentation de la température du milieu (Cheng et al., 2004; Travers et al., 2008, 2009). Par ailleurs, cette diminution des variables immunitaires résulte en une plus grande susceptibilité de ces ormeaux face à des vibrions.

Salinité et agent pathogène

En milieu hypersalin, l'infection de la palourde *M. mercenaria* par le parasite QPX est associée à une dépression immunitaire marquée par la baisse des taux de phagocytose et de la production d'ERO (Perrigault et al., 2012). Par contre, en milieu hyposalin, aucune différence n'est observée entre les paramètres immunitaires observés chez les individus infectés ou non. Cependant, aucuns signes cliniques de la maladie associée à QPX n'ont été observés quelle que soit la condition et les mortalités sont restées relativement faibles, probablement du fait d'une température du milieu suffisamment élevée (17 °C) (Perrigault et al., 2011, 2012). Malgré tout, ces résultats indiquent une plus grande résistance de *M. mercenaria* face au parasite QPX en milieu hyposalin puisque les mortalités associées y sont plus faibles qu'en milieu hypersalin. Les auteurs émettent par ailleurs l'hypothèse que le facteur salinité est de moindre importance dans le développement de la maladie comparé au facteur température.

De hautes salinités entraînent une amélioration de la CHT et du taux de granulocytes chez *C. virginica* (Chu et al., 1993). Par ailleurs, cette augmentation des paramètres hématocytaires n'a pas eu de répercussions sur l'infection de cette huitre par *P. marinus*. Cependant, les intensités d'infection par *P. olseni* sont positivement corrélées à la salinité. Ainsi, des paramètres intrinsèques au pathogène influençables par les faibles salinités seraient susceptibles d'expliquer les faibles intensités observées en milieu hyposalin (La Peyre et al., 2010; Soudant et al., 2013).

2.4.4. Effets de paramètres internes

La maturité sexuelle chez *C. gigas* s'accompagne par une modulation des taux de phagocytose, de la viabilité des hémocytes, du pourcentage de granulocytes ou encore des activités peroxydases qui sont diminuées chez les individus les plus matures (Gagnaire et al., 2006). Par ailleurs, ces paramètres sont particulièrement faibles après ponte chez *C. gigas*. Après la ponte partielle ou totale chez *H. tuberculata*, une surproduction des ERO concomitante à une diminution des taux de phagocytose et des activités PO dans l'hémolymphe renforcent cette idée (Travers et al., 2008).

De plus, la production des ERO chez les bivalves peut être modulée par les paramètres intrinsèques de ces animaux (Canesi, 2015). L'activité de reproduction peut être perçue comme un stress physiologique puisqu'elle occasionne des dépenses énergétiques, des activités métaboliques accrues. Cela requiert donc une augmentation des activités mitochondriales et peut donc résulter dans la hausse de la production des ERO. Cela a été observé chez *C. gigas* dont la production des ERO par les hémocytes a été corrélée à l'effort de reproduction de l'animal (Delaporte et al., 2007).

Par ailleurs, l'âge de l'animal peut également influencer sa réponse immunitaire comme cela a été montré chez *M. edulis*. En effet, le vieillissement de la moule *M. edulis* a été associé à la diminution des activités CAT et GPx et à l'augmentation de la peroxydation lipidique (Viarengo et al., 1991; Sukhotin et al., 2002).

2.5. Le métabolisme énergétique chez les invertébrés marins

2.5.1. Les réserves énergétiques

Les êtres vivants constituent des réserves énergétiques mobilisables afin d'assurer les processus biologiques tels que la survie, la reproduction, la croissance ou encore la réponse immunitaire. Ces réserves énergétiques comprenant les principales macromolécules que sont les lipides, les protéines et les glucides, sont fournies *via* l'apport trophique.

Les réserves glucidiques, en particulier le glycogène, constituent la principale réserve énergétique chez les palourdes adultes *R. philippinarum* et *R. decussatus* au moment de la gamétogénèse (Beninger and Lucas, 1984; Laing, 1993). Pendant cette période, la palourde utilise également les lipides, en particulier les triglycérides (TAG), comme source d'énergie (Beninger and Lucas, 1984; Beninger and Stephan, 1985). Enfin, les protéines sont également impliquées dans la production d'énergie chez les palourdes adultes, notamment dans les tissus somatiques lorsque les réserves glucidiques et lipidiques sont utilisées pour la gamétogénèse (Beninger and Lucas, 1984).

2.5.2. Production d'énergie

La respiration cellulaire est la voie catabolique qui permet de produire de l'énergie sous la forme d'un intermédiaire énergétique : l'adénosine tri-phosphate (ATP). Deux types

de catabolismes peuvent être mis en place lors de la respiration cellulaire : la voie aérobie et la voie anaérobie. La respiration aérobie est la voie la plus efficace en termes de production de molécules d'ATP. Elle nécessite la présence de O_2 , de molécules organiques et d'un gradient électro-chimique comme cela a été décrit dans la section 2.3.1.1.. Les réactions chimiques associées à cette voie catabolique sont effectuées en 3 principales étapes : la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale.

La glycolyse correspond à une cascade réactionnelle constituée de 10 étapes catalysées par des enzymes cytosoliques. Ce processus permet de produire 2 molécules d'ATP et 2 molécules de NADH pour une molécule de glucose dégradée. Le contrôle de la glycolyse est effectué par l'activité de 3 enzymes allostériques impliquées dans cette cascade : l'hexokinase (HK), la phosphofructokinase (PFK) et la pyruvate kinase (PK).

Le pyruvate produit lors de la glycolyse est ensuite utilisé dans le cycle de Krebs afin d'en extraire l'énergie. Ce cycle constitué de 8 étapes a lieu dans la mitochondrie, et aboutit à la formation d'1 ATP, de 3 NADH et d'1 $FADH_2$ pour une molécule de pyruvate dégradée. Une des enzymes clés de ce cycle est la citrate synthase (CS), son activité est mesurée chez les invertébrés marins car elle reflète généralement le taux de respiration de ces animaux (Moran and Manahan, 2004). Par ailleurs, la principale source d'énergie à l'origine du pyruvate est le glucose même s'il peut également provenir de la dégradation des lipides ou des protéines.

Enfin, les molécules de NADH et $FADH_2$ issues du cycle de Krebs sont utilisées dans la chaîne respiratoire mitochondriale qui, grâce aux transports d'électrons effectués par différents complexes enzymatiques, permet la production d'ATP.

Le métabolisme énergétique permet de restituer des molécules réduites telles que le NADH, NADPH mais également l'énergie sous forme d'ATP nécessaire à la réponse immunitaire, au contrôle du cycle cellulaire et à la régulation des macromolécules (Kültz, 2005). De plus, un lien étroit existe entre le métabolisme énergétique et les réactions antioxydantes via la voie des pentoses phosphates (PP) en conditions stressantes (Kültz, 2005; Zapata-Vivenes and Nusetti, 2007).

2.5.3. Modulation du métabolisme énergétique par l'environnement

2.5.3.1. Effet de stressseurs biotiques

Agents pathogènes

L'exposition de l'huître *C. virginica* au parasite *H. nelsoni* entraîne une réduction des réserves en glycogène de l'hôte et plus généralement une baisse de son indice de condition (Barber et al., 1988). Chez *R. philippinarum*, les mêmes constats ont été faits suite à l'infection par *V. tapetis* (Gouletquer et al., 1989; Plana, 1995; Plana et al., 1996).

Outre les déplétions en glycogène, les activités enzymatiques reliées au métabolisme énergétiques peuvent également être modulées par l'exposition à des agents pathogènes. Par exemple, l'activité HK d'huitres *C. gigas* est diminuée suite à une infection naturelle par OsHV-1, *V. splendidus* ou les deux (Pernet et al., 2012). De même, cette activité semble être modulée dans les larves de *C. gigas* suite à une exposition à *V. coralliilyticus* (Genard et al., 2013). Une approche en protéomique a mis en évidence l'implication de voies métaboliques énergétiques telles que la glycolyse et la lipolyse chez l'huître *C. gigas* après exposition au virus OsHV-1 (Corporeau et al., 2014).

Micro-algues

La diminution de la ressource trophique dans le milieu conduit à l'amenuisement des réserves de l'animal. Par exemple, les palourdes *R. philippinarum* à jeun utilisent prioritairement les réserves en glycogène afin de survivre (Laing, 1993). Par ailleurs, une augmentation de la concentration micro-algale dans le milieu induit une augmentation de ces réserves chez l'huître *Pinctada margaritifera* (Chávez-Villalba et al., 2013).

La composition biochimique des algues, notamment en termes de lipides, de protéines et de glucides, influence directement celle des mollusques bivalves et par conséquent leur utilisation en tant que carburant énergétique pour assurer le fonctionnement des processus biologiques (Andres Aranda-Burgos et al., 2014; Delaporte et al., 2003; Fernandez-Reiriz et al., 2015).

Par ailleurs, la composition en acides gras (AG) des lipides des micro-algues a des répercussions sur le métabolisme énergétique des bivalves et donc sur diverses fonctions telles que la gamétogénèse, l'embryogénèse, la croissance, la défense immunitaire ou

encore la survie des mollusques bivalves (Marty et al., 1992; Soudant et al., 1996a, 1996b; Caers et al., 1999; Delaporte et al., 2003; Pernet and Tremblay, 2004; Delaporte et al., 2005; Da Costa et al., 2012). Plus particulièrement, ces études ont mis en évidence le rôle d'AG essentiels tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA; 20:5n-3), l'acide docosahexaénoïque (DHA; 22:6n-3) et l'acide arachidonique (AA; 20:4n-6) présents dans les lipides neutres et polaires⁵ fournis par les micro-algues dans ces fonctions.

Enfin, la présence de micro-algues toxiques dans l'environnement influence également la composition, l'utilisation des réserves énergétiques et le métabolisme énergétique des bivalves. En effet, l'exposition de ces animaux à *Alexandrium* spp. provoque une diminution des réserves lipidiques et notamment des AG libres, des mono- et diacylglycérols, des réserves en glucides ainsi qu'une altération des activités enzymatiques associées à la digestion (Fernández-Reiriz et al., 2008; Haberkorn et al., 2010).

2.5.3.2. Effet de stressseurs abiotiques

Température

L'augmentation de la température a été associée à l'augmentation des réserves en glycogène chez *R. philippinarum* (Mann, 1979). De plus, l'augmentation de la température associée à la présence de nourriture dans le milieu peut déclencher les processus reproductifs chez *R. philippinarum*, l'amenant à consommer rapidement ses réserves en glycogène et accumuler les lipides (Mann, 1979; Laing and Child, 1996; Fernández-Reiriz et al., 2007). Inversement, à des températures basses (14 °C), le développement des gonades est réduit chez cette espèce et on observe alors une accumulation des réserves énergétiques sous la forme de glucides (Fernández-Reiriz et al., 2007).

Oxygénation

La diminution de l'oxygène provoque une déplétion des réserves en glycogène associée à une dépression métabolique chez *M. edulis* (Isani et al., 1995). Par ailleurs, la combinaison du facteur température et du facteur oxygénation du milieu entraîne généralement des modifications de la consommation des réserves en lipides et en glucides

⁵ Les lipides neutres sont des lipides de réserve essentiellement constitués de triglycérides et de stérols alors que les lipides polaires sont majoritairement constitués de phospholipides et représentent généralement la composition lipidique des membranes cellulaires.

chez les mollusques bivalves. Lors d'épisodes anoxiques, les activités enzymatiques PK et HK diminuent chez *C. virginica* et *C. gigas* et cette diminution est d'autant plus marquée que la température du milieu est basse (Greenway and Storey, 1999, 2000; Le Moullac et al., 2007a, 2007b).

Contaminants

L'exposition de l'huître *C. gigas* à des doses environnementales d'un mélange de metconazole et d'isoproturon conduit à la baisse de l'activité HK (Epelboin et al., 2015). De plus, la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), une protéine impliquée dans le transport et la prise en charge du glucose dans la glycolyse, est suractivée chez ces animaux. Ces résultats *a priori* contradictoires peuvent s'expliquer par une surexpression constitutive de l'AMPK induisant à long terme une dérégulation de la glycolyse. Une autre possibilité réside dans l'inactivation des enzymes de la glycolyse par les pesticides indépendamment de l'activation de l'AMPK (Epelboin et al., 2015).

2.5.3.3. Effet couplé de stressseurs biotiques et abiotiques

Dans le cadre des épisodes de mortalité massive d'huîtres *C. gigas* en 2008, il a été montré que plusieurs facteurs environnementaux étaient susceptibles de mener à l'affaiblissement des animaux. En effet, ces mortalités ont été associées à des modulations des réserves énergétiques et particulièrement de la composition en AG des lipides neutres et polaires des animaux (Pernet et al., 2010, 2014). Ces changements sont à mettre en relation avec une modification de la nourriture, une acclimatation des huîtres à l'augmentation de la température du milieu ou encore à une surproduction d'ERO suite à des conditions stressantes.

L'infection de *C. gigas* par OsHV-1 simultanément à une augmentation de la température induit la baisse des réserves énergétiques chez cet animal. Cependant, la baisse des réserves en lipides, glucides et protéines n'a pas été associée à des activités HK, PK et CS différentes entre les animaux sains et infectés (Tamayo et al., 2014).

2.5.3.4. Effet de facteurs internes

Le statut de reproduction des bivalves est un des facteurs internes majeurs influençant le stockage/l'utilisation des réserves chez ces animaux. La principale source d'énergie utilisée par *R. philippinarum* est le glycogène notamment lors de la gamétogénèse ou lors de périodes hivernales dans les eaux tempérées (Beninger and Lucas, 1984). Les lipides et les glucides sont à leur niveau maximal au moment de la ponte car ces réserves sont notamment des composants des ovocytes chez les bivalves. Les valeurs maximales de réserves en protéines sont également observées au moment de la ponte *a priori* car elles serviraient à fournir l'énergie aux tissus somatiques pendant cette période.

Les lipides peuvent également servir de réserve énergétique lors de ces périodes hivernales qui sont associées à des insuffisances nutritionnelles. L'utilisation des protéines comme réserve énergétique est également observée chez les adultes lors de la gamétogénèse (Beninger and Stephan, 1985).

Egalement, le sexe de l'animal peut être un facteur influençant la constitution des réserves. D'ailleurs, la théorie générale est que la production des ovocytes chez les bivalves nécessite plus d'énergie que la production de spermatozoïdes, ce qui résulte en besoins métaboliques différents selon le sexe de l'animal (Wright, 1988). Chez l'huitre *P. margaritifera*, les réserves en glycogène dans le muscle sont plus importantes chez les mâles, renforçant ainsi cette théorie (Chávez-Villalba et al., 2013).

L'âge de l'animal constitue un autre paramètre interne influençant le métabolisme énergétique comme cela a été observé chez *M. edulis* dont l'activité CS diminue avec l'âge de l'individu (Sukhotin and Pörtner, 2001). Cela serait dû à une baisse des taux de respiration chez les animaux plus âgés, se traduisant ainsi par une diminution du métabolisme énergétique.

3. Un modèle d'interaction hôte-pathogène-environnement : la maladie de l'anneau brun (MAB)

3.1. La MAB : signes cliniques

La maladie de l'anneau brun (MAB) a été détectée pour la première fois sur le site du Brouennou dans le pays des abers, à Landéda (Finistère, France) où elle a provoqué des épisodes de mortalité massive à la fin des années 1980. D'autres épisodes de mortalité associés à la MAB ont été reportés le long des côtes françaises, puis italiennes en 1990, espagnoles en 1993, britanniques en 1997, irlandaises en 1998, tunisiennes en 2000 et enfin les côtes norvégiennes en 2003 (Gouletquer and Université de Bretagne occidentale, 1989; Paillard, 2004a). Enfin, l'expansion de la MAB ne s'est pas arrêtée aux côtes européennes puisque celle-ci a été détectée en Corée du Sud en 2003 et au Japon en 2004 (Park et al., 2008).

Cette maladie affecte aussi bien les juvéniles que les adultes. Son signe clinique caractéristique est la présence d'un dépôt brun sur la surface interne des coquilles entre le bord de la coquille et la ligne palléale (Figure 15) (Flassch et al., 1992; Paillard and Maes, 1990).



Figure 15 : Photographie d'une coquille de palourde *Ruditapes philippinarum* présentant un dépôt de conchioline indiqué par les flèches sur chaque valve – D'après Paillard, 2004b.

Ce dépôt brun est une matrice organique issue de la décalcification de la coquille et a été caractérisé comme étant de la conchioline. Cette matière organique est insoluble dans l'eau et contient des pigments de type mélanine (Paillard, 1992; Paillard et al., 1994). Des coupes transversales de « coquilles saines », i.e. ne présentant aucun signe clinique de la

MAB ont permis de distinguer 3 couches : le périostracum, la couche prismatique et la couche interne porcelanée. Les coquilles des individus malades présentent en plus de ces couches, une couche conchioline entre la couche interne et le manteau (Figure 16).

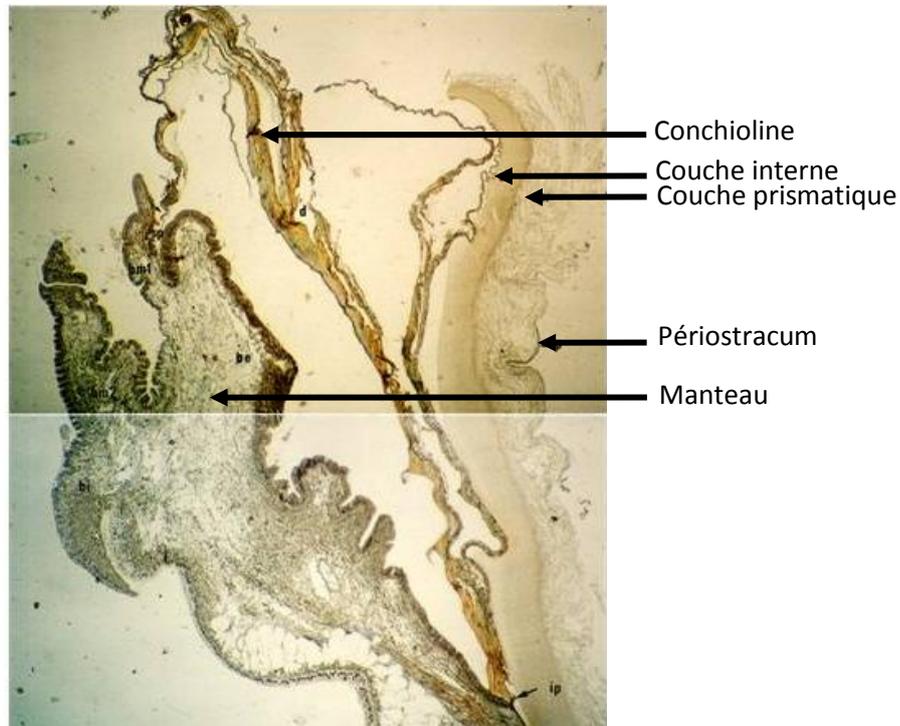


Figure 16 : Coupe transversale d'une coquille présentant les signes cliniques de la MAB – d'après Paillard & Le Penec, 1993.

Lors des premiers stades de la MAB, le dépôt de conchioline n'est pas encore complètement visible et nécessite l'utilisation de la loupe binoculaire afin de le détecter. Ces premiers signes cliniques se traduisent d'abord par l'apparition de petites taches brunes concentriques (Figure 17) ou d'un film organique de couleur brun clair.



Figure 17 : Photographie du bord d'une coquille présentant les premiers signes cliniques de la MAB sous la forme de petites taches brunes – D'après Paillard, 2004b.

Puis, au fur et à mesure du développement de la maladie, les taches évoluent en dépôts visibles à l'œil nu, s'étendant et s'épaississant de plus en plus sur la surface interne de la coquille. Ainsi, une classification macroscopique des signes cliniques de la MAB⁶ a été proposée afin de permettre un diagnostic plus aisé. Celle-ci est basée sur l'extension et l'épaisseur du dépôt de conchioline mais également sur les compartiments de la coquille qui sont touchés (Figure 18).

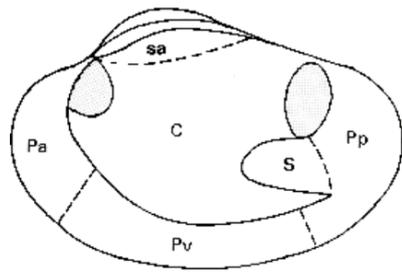


Figure 18 : Schéma de la surface interne de la coquille d'une palourde et des compartiments qui la constituent – D'après Paillard & Maes, 1994.

Abbréviations : Pa = compartiment périphérique antérieur ; Pv = compartiment périphérique ventral ; Pp = compartiment périphérique postérieur ; S = compartiment sinusal ; C = compartiment central ; sa = compartiment sub-articulaire. D'après Paillard & Maes, 1994.

En plus du dépôt de conchioline observé chez les individus atteints de la MAB, un autre signe clinique a été mis en évidence : la réparation coquillère (Figure 19). Il s'agit du recouvrement de la zone de dépôt, quelle que soit son épaisseur, par des couches calcaires (Paillard et al., 1994). Ainsi, ce second critère a été ajouté à la classification des signes cliniques de la MAB et ce sont 5 stades de réparation⁷ qui ont été définis pour ce critère (Paillard and Maes, 1994; Paillard, 2004b).

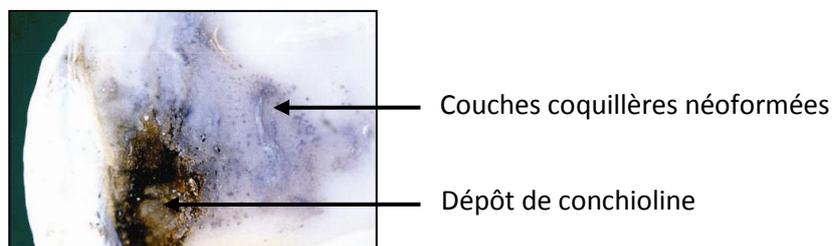


Figure 19 : Photographie du bord d'une coquille présentant des dépôts bruns visibles par transparence sous des couches coquillères néoformées. D'après Paillard, 2004b.

⁶ Une clé détaillée de ces différents stades est proposée dans la section « Matériel et méthodes »

⁷ Les stades de réparation coquillère sont décrits dans la section « Matériel et méthodes »

3.2. Caractérisation du pathogène associé à la MAB: *Vibrio tapetis*

3.2.1. De la transmission et de la reproduction de la MAB...

Les études menées sur le suivi de la MAB chez *R. philippinarum in situ* et la propagation de la maladie sur de nombreux parcs vénériques dans le pays des abers ont mis en évidence le caractère transmissible de la MAB (Paillard, 1992). Ainsi, la recherche d'agent étiologique a été effectuée d'abord au moyen d'observations histopathologiques sur les individus atteints de la MAB.

Cependant, aucun parasite ou microorganisme déjà connu n'a pu être associé aux signes cliniques observés (Paillard, 1992). C'est finalement en inoculant des broyats de palourdes infectées à des palourdes saines que ces signes ont pu être reproduits, démontrant ainsi la transmission de la MAB (Paillard et al., 1989).

Suite à l'étude de la transmission de la MAB, les broyats d'animaux malades ont été utilisés afin d'en isoler les micro-organismes et plus spécifiquement, les champignons et les bactéries (Paillard et al., 1989). Ainsi, une des bactéries isolées, nommée VP1 (Vibron Prédominant 1) a été injectée chez des palourdes saines et a permis la reproduction des signes cliniques de la MAB. Cette bactérie a alors été identifiée comme étant l'agent étiologique de la MAB.

3.2.2. ... A la caractérisation d'un agent étiologique de la MAB

L'agent pathogène responsable de la MAB a finalement été isolé en 1994, il s'agit de la bactérie *Vibrio tapetis* (Paillard et al., 1994; Borrego et al., 1996b). C'est un bacille Gram – qui a la particularité de ne pas utiliser le mannitol et qui meurt au-delà de 25 °C (Maes and Paillard, 1992).

Par ailleurs, les postulats de Koch ont pu être vérifiés dans le cadre de la MAB :

- Description des signes cliniques chez les individus malades en association avec la présence du micro-organisme ;
- L'inoculation du micro-organisme isolé et cultivé *in vitro* chez des animaux sains déclenche la maladie ;

- Isolement du micro-organisme à partir d'individus développant des signes cliniques suite à une infection expérimentale ;
- Identification de ce micro-organisme comme étant le même que celui originellement isolé.

Depuis le premier isolement de *V. tapetis* chez *R. philippinarum*, d'autres souches de cette bactérie ont pu être isolées en France mais également dans d'autres pays et sur d'autres espèces de mollusques mais également chez les poissons (Castro et al., 1992; Maes and Paillard, 1992; Jensen et al., 2003; Reid et al., 2003; Paillard, 2004a; Matsuyama et al., 2010; Lopez et al., 2011). A l'heure actuelle, la première souche isolée à partir des palourdes retrouvées malades à Landéda, CECT4600^T, reste une des souches les plus virulentes *in vitro* vis-à-vis de *R. philippinarum* (Choquet et al., 2003; Choquet, 2004).

La virulence de *V. tapetis* est caractérisée par différents composants tels que la présence de *pili* à leur surface leur permettant d'adhérer à la lame périostacale lors de la première étape menant à l'infection de la palourde (Paillard and Maes, 1995a, 1995b).

De plus, *V. tapetis* possède des hémolysines qui peuvent altérer les cellules en provoquant des pores ou encore en lysant les lipides (Borrego et al., 1996b). La présence d'un gène codant pour un type particulier d'hémolysine, le type lécithinase, a été observée chez *V. tapetis* (Paillard, 2004b). Des chitinases, protéases, lipases ou encore des adhésines ont également été retrouvées dans les produits extracellulaires sécrétés par la bactérie (Madec et al., 2014). Par ailleurs, la capacité de cette bactérie à provoquer la mort de l'animal lorsqu'elle directement injectée dans l'hémolymphe constitue un autre élément démontrant sa virulence (Allam et al., 2002).

Vibrio tapetis est également responsable de la perte des propriétés d'adhérence des hémocytes en induisant des modifications du cytosquelette des hémocytes, notamment via l'inhibition de la formation des filaments d'actine nécessaire à l'extension des pseudopodes (Choquet et al., 2003).

Enfin, parmi les gènes identifiés chez *V. tapetis*, le gène *virB4*, présent uniquement chez ce pathogène, code pour une protéine impliquée dans les systèmes de sécrétions de type IV (Bidault et al., submitted). Ces systèmes sont particulièrement importants en tant

que facteurs de virulence chez les bactéries Gram – puisqu'ils permettent à la bactérie d'injecter directement de l'ADN et des protéines dans les cellules de l'hôte via leurs *pili*.

3.2.3. Les étapes menant à l'infection de *R. philippinarum* par *V. tapetis*

La première étape du processus d'infection de la palourde par *V. tapetis* consiste en l'entrée du pathogène dans l'organisme. Cette bactérie pénètre dans la palourde via la cavité palléale ou via les siphons de l'animal. Elle va ensuite adhérer à la lame périostracale à l'aide de ses *pili*. *Vibrio tapetis* colonise ensuite la lame périostracale puis la couche interne de la coquille, le bord du manteau et enfin le périostracum (Paillard, 1992; Paillard and Le Penec, 1993; Paillard et al., 1994; Paillard and Maes, 1995a, 1995b).

Suite à cette colonisation, la bactérie va dégrader le périostracum, induisant ainsi chez la palourde une réponse de défense associée à la production du dépôt de conchioline. Cette matrice organique recouvre les colonies de *V. tapetis* via le processus d'encapsulation mélanotique impliquant les PO (Paillard, 2004a, 1992; Paillard et al., 1994).

Si la circonscription des pathogènes n'est pas suffisante, la dégradation et la rupture de la lame périostracale vont entraîner l'entrée de *V. tapetis* dans les fluides extrapalléaux de la palourde. Le dépôt de conchioline s'étend alors de plus en plus et s'épaissit (Paillard, 2004b).

L'épaississement de l'anneau brun et la condition générale de l'animal en périodes hivernales peuvent provoquer des lésions au niveau du manteau. Si cela se produit, *V. tapetis* peut alors en « profiter » pour entrer dans les tissus et par conséquent dans le système circulatoire de la palourde. L'animal risque alors la septicémie et meurt (Allam et al., 2002; Paillard, 2004a). Ces différentes étapes sont résumées dans la Figure .

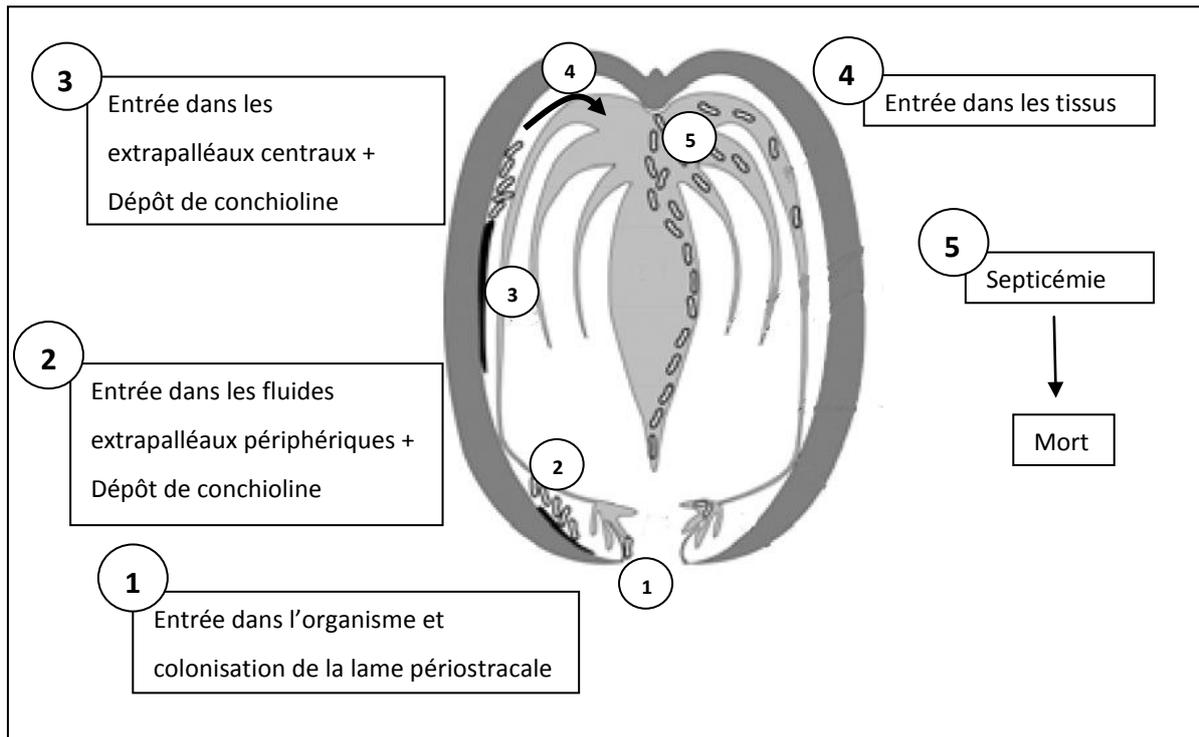


Figure 20 : Schéma récapitulatif de la mise en place de l'infection de *R. philippinarum* par *V. tapetis* – Adapté d'après Paillard, 2004b.

3.3. Les différents modes d'infection de *R. philippinarum* par *V. tapetis* en milieu contrôlé

Plusieurs types d'infections expérimentales de *R. philippinarum* par *V. tapetis* ont été testés au cours des 25 dernières années, ceci afin de répondre à des questionnements scientifiques différents. La méthode d'infection se rapprochant le plus des conditions naturelles est l'exposition des palourdes à leur pathogène par balnéation. Néanmoins, cette méthode permet difficilement de contrôler les concentrations bactériennes infectant les palourdes mais également d'obtenir des résultats rapides en termes de développement de la MAB en comparaison aux méthodes d'injection (Maes and Paillard, 1992; Paillard, 2004b).

Les méthodes d'injection de *V. tapetis* sont au nombre de quatre : l'injection dans le muscle adducteur, l'injection dans la cavité palléale, l'injection dans la cavité extrapalléale centrale et l'injection dans la cavité extrapalléale périphérique. L'injection dans le muscle adducteur a permis de mettre en évidence le caractère létal de *V. tapetis* une fois entré dans la circulation hémolympatique (Paillard, 2004b; Allam et al., 2006). Ce type d'injection induit si rapidement la mortalité des animaux qu'il ne permet pas d'observer les différents

stades sub-léthaux associés au développement de la maladie. De même, les mortalités associées à l'injection en cavité extrapalléale centrale débutent dès 4 jours post-injection pour atteindre 100 % à 14 jours (Allam et al., 2002). L'injection « la plus proche » de ce qui est observé en milieu naturel correspond à celle effectuée dans la cavité palléale mais elle ne permet pas d'obtenir des effets sub-létaux aussi rapidement que dans le cas d'une injection en cavité extrapalléale périphérique (Paillard, 2004b; Le Bris et al., 2015). **C'est ce dernier type d'injection qui a été choisi pour les expérimentations menées lors de cette thèse puisqu'il occasionne un taux de mortalité très faible (moins de 10 %) à l'issue de 30 jours d'exposition des animaux et que les effets sub-léthaux causés par la MAB sont visibles assez rapidement.**

3.4. Réponses de *R. philippinarum* à l'infection par *V. tapetis*

3.4.1. Réponse immunitaire

3.4.1.1. Réponse à médiation cellulaire

Modifications de la concentration en hémocytes totaux dans l'hémolymphe et dans les fluides extrapalléaux : un indice de l'infiltration hémocytaire vers le site infectieux

Le rôle des hémocytes présents aussi bien dans l'hémolymphe (HE) que dans les fluides extrapalléaux (FE) de *R. philippinarum* a été exploré dans le cadre d'infections contrôlées par *V. tapetis*. L'injection de *V. tapetis* dans la cavité palléale de la palourde provoque une augmentation rapide de la CHT dans l'HE des animaux infectés de 3 heures jusqu'à 2 semaines post-challenge (Oubella et al., 1993, 1994, 1996; Allam et al., 2000a). Suite à cela, la CHT hémolympatique va diminuer afin jusqu'à atteindre un état stable 4 à 7 semaines post-challenge (Oubella et al., 1994).

En outre, Oubella et al. (1996) ont montré que le taux de granulocytes, généralement associés au processus de phagocytose, était plus important chez les individus malades. La CHT des FE est elle aussi augmentée suite à l'injection palléale de *V. tapetis* mais moins rapidement que dans l'HE. En effet, c'est seulement à partir de 3 jours post-challenge qu'une augmentation de la CHT est observée et ce, jusqu'à la fin de l'expérimentation (Allam et al., 2000a, 2000b).

Ces travaux ont finalement permis d'émettre l'hypothèse qu'une infection palléale de *R. philippinarum* par *V. tapetis* induisait une réponse immunitaire cellulaire en deux étapes :

- De quelques heures à 7 jours post-challenge, les hémocytes sont mobilisés à partir des tissus vers la circulation hémolymphatique ;
- A partir de 7 jours post-challenge, les hémocytes s'infiltrèrent vers le site d'infection en s'accumulant dans les FE directement en contact avec la lame périostracale.

Cette réponse est à associer au développement des signes cliniques de la MAB puisque ceux-ci sont particulièrement visibles à partir de 7 jours post-challenge.

Une diminution de la capacité phagocytaire des hémocytes : un effet d'inhibition associé au pathogène ?

L'évaluation des paramètres hémocytaires suite à l'infection par *V. tapetis* a fait l'objet d'une étude *in vivo* sur 3 lots de palourdes présentant des résistances plus ou moins accrues à la MAB : *R. decussatus* > *R. philippinarum* (USA) > *R. philippinarum* (France)⁸. Chez les animaux infectés, le nombre de granulocytes ainsi que les taux de phagocytose dans l'HE et les FE étaient augmentés pour *R. decussatus*, stables chez *R. philippinarum* provenant des USA et particulièrement diminués chez *R. philippinarum* provenant de la France (Allam et al., 2001). Cette étude suggère donc que la résistance de la palourde à l'infection par *V. tapetis* est reliée à la concentration en granulocytes ainsi qu'à l'activité phagocytaire des hémocytes. Finalement, Allam et al. (2001) expliquent que la dépression de cette activité dans le lot français de *R. philippinarum* pourrait faire suite à une diminution des conditions physiologiques de l'animal malade et/ou aux effets inhibiteurs occasionnés par *V. tapetis* sur cet hôte.

Par ailleurs, l'infection *in vivo* de *R. philippinarum* par *V. tapetis* induit la chute du taux de phagocytose de cette bactérie dans l'HE dans les premières heures post-challenge jusqu'à ce qu'il soit nul 3 jours post-challenge (Allam et al., 2002). Cette baisse d'activité est également observée dans les FE où le taux de phagocytose est au plus haut 2 heures post-challenge (60 %) mais diminue drastiquement pour atteindre 7 % 3 jours post-challenge (Allam et al., 2002).

⁸ Il a été montré que, suite à des inoculations de *V. tapetis*, *R. decussatus* développait la MAB à seulement 18 % contre 80 % chez *R. philippinarum* (Paillard, 2004).

La baisse de l'activité phagocytaire chez la palourde japonaise a été reliée à la perte des pseudopodes des hémocytes provoquant un arrondissement de ces cellules ne pouvant plus assurer la phagocytose (Choquet et al., 2003; Choquet, 2004). Par ailleurs, cette étude a comparé l'effet de différents vibrions sur les hémocytes de *R. philippinarum* et a permis de montrer la pathogénicité spécifique de *V. tapetis* envers la palourde japonaise.

L'exposition *in vitro* des hémocytes de *R. philippinarum* à des cellules entières de *V. tapetis* et à ses produits extra-cellulaires résulte en une diminution de la viabilité, du taux de phagocytose mais aussi en des modifications structurales de ceux-ci (Allam and Ford, 2006).

3.4.1.2. Réponse à médiation humorale

La reconnaissance de *V. tapetis* dans l'hémolymphe de *R. philippinarum*

Plusieurs études ont montré l'implication des lectines dans la reconnaissance des agents pathogènes chez les bivalves. Particulièrement, l'injection de *V. tapetis* directement dans le muscle adducteur postérieur de *R. philippinarum* induit la surexpression des gènes codant pour la lectine MCL3 et pour la galectine MCGAL 1 jour post-challenge (Kim et al., 2008a, 2008b). Par ailleurs, l'activité de la protéine recombinante rMCGAL a été associée au processus d'agglutination de *V. tapetis* par les hémocytes de *R. philippinarum* (Kim et al., 2008a).

Modulation des activités des enzymes hydrolytiques de façon concomitante avec la CHT de l'HE et des FE

L'augmentation de l'activité LAP a été constatée dans les hémocytes de *R. philippinarum* respectivement de 3 à 7 jours après injection de *V. tapetis* dans la cavité palléale et l'HE. Puis, à partir de 2 semaines post-challenge, l'activité LAP diminue dans les hémocytes et l'HE de la palourde de façon concomitante avec la CHT de l'HE (Oubella et al., 1994). De plus, une augmentation de l'activité lysozyme a été observée dès les premières heures dans l'HE et les FE de *R. philippinarum* suite à l'injection de *V. tapetis* en cavité palléale (Allam and Paillard, 1998; Allam et al., 2000a). Ensemble, ces résultats indiquent la capacité de la palourde japonaise à produire et à mobiliser très rapidement les enzymes hydrolytiques afin de lutter contre *V. tapetis* que ce soit dans l'HE ou les FE.

Production de molécules toxiques dans l'HE, les FE et le manteau et détoxification ?

De récents travaux menés par Le Bris et al. (2015) ont mis en évidence l'implication de la PO dans la réponse de la palourde japonaise exposée à *V. tapetis* par injection extrapalléale. Une augmentation de cette activité dans l'HE a été observée de 7 jours jusqu'à 30 jours post-challenge chez les individus injectés par la souche de *V. tapetis*. Cette étude a également montré l'augmentation des activités PO et SOD dans le manteau des individus 36 heures post-injection. Une telle réponse suggère d'une part, la production de composés toxiques dans le but de circonscrire l'infection et d'autre part, la détoxification d'ERO formées en réponse à *V. tapetis*. Par ailleurs, de nombreuses études transcriptomiques ont mis en évidence l'implication des enzymes antioxydantes dans la réponse précoce des palourdes japonaises exposées à *V. tapetis*. En effet, l'expression des gènes codant pour SOD, la GST, la Trx est augmentée dans les deux jours suivant une exposition de *R. philippinarum* à *V. tapetis* (Revathy et al., 2012a, 2012b; Umasuthan et al., 2012a, 2012b, 2012c; Bathige et al., 2014). Ces études suggèrent que le système antioxydant aurait un rôle dans la pathogénèse de la MAB. Le suivi de l'activité de ces enzymes au cours d'infections expérimentales de palourdes à *V. tapetis* serait donc une piste intéressante à suivre.

Enfin, une étude a mis en évidence la production de nitrites, qui sont des produits de décomposition de NO, dans l'HE et les FE de la palourde japonaise suite à une exposition *in vitro* à *V. tapetis* (Jeffroy and Paillard, 2011).

Intervention de MMAPs et d'inhibiteurs de protéases ?

Plusieurs transcrits correspondant aux défensines ont été identifiés chez *R. philippinarum*, dont notamment la « big defensin ». Une surexpression du gène codant pour cette défensine a été observée dans le manteau et les hémocytes de *R. philippinarum* suite à une exposition à *V. tapetis* (Jeffroy et al., 2013).

Par ailleurs, les serpins, des inhibiteurs de protéases notamment impliqués dans la régulation du système d'activation de la PO, sont également surexprimés dans les hémocytes, les FE et le manteau de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis* (Brulle et al., 2012; Jeffroy et al., 2013; Allam et al., 2014).

3.4.2. Réponses associées au métabolisme énergétique

Plusieurs études ont mis en évidence la diminution des réserves énergétiques, particulièrement des réserves en glycogène, chez les individus infectés par *V. tapetis* (Gouletquer et al., 1989; Plana, 1995; Plana et al., 1996). Par ailleurs, Plana et al. (1996) ont conclu que les mortalités observées sur le terrain pouvaient être le résultat d'une altération du métabolisme énergétique des animaux infectés.

Les premières conséquences de la MAB sur la physiologie de la palourde résident dans la diminution du poids de l'animal et donc de son indice de condition (Paillard, 1992; Flye-Sainte-Marie et al., 2007). Le taux de croissance de l'animal est lui aussi négativement impacté par le développement de la MAB, vraisemblablement parce que la lame périostracale qui à l'origine de la biominéralisation est altérée (Paillard, 1992; Flye-Sainte-Marie et al., 2007, 2009). En plus de ce ralentissement de la croissance, la palourde peut également rencontrer des périodes d'arrêts de croissance (Figure 21) menant à la déformation de la coquille (Paillard, 1992).

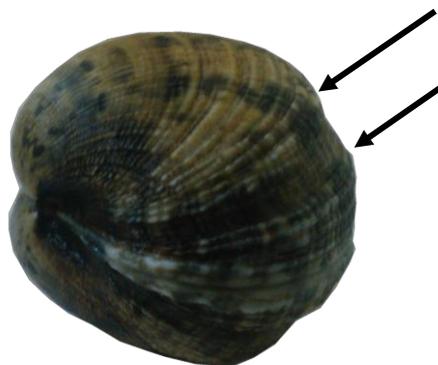


Figure 21 : Photographie d'une palourde ayant subi plusieurs arrêts de croissance (indiqués par les flèches).

Des altérations de la glande digestive, du manteau et des branchies des animaux ont été observés chez les individus infectés dont le développement de la maladie est très avancé (Plana and Le Pennec, 1991; Paillard, 1992; Plana, 1995). Ces altérations peuvent avoir des implications notamment sur le processus de nutrition et donc sur l'acquisition et le stockage des réserves énergétiques chez l'animal. Finalement, lorsque la palourde est infectée, elle doit faire face à un compromis énergétique entre sa croissance, son stockage de réserves énergétiques et sa défense immunitaire suite à l'infection (Flye-Sainte-Marie et al., 2009).

3.5. Influence de l'environnement sur l'interaction *R. philippinarum* / *V. tapetis*

3.5.1. La MAB : une maladie d'eau froide ?

Les études de prévalence et d'intensités de la MAB menées sur le terrain ont suggéré que la température était un facteur particulièrement déterminant dans le développement de cette maladie (Paillard et al., 1997).

De plus, il a été montré que la croissance de *V. tapetis* était inhibée en dessous de 4 °C et au-delà de 25 °C (Paillard et al., 1997). Des expérimentations d'infection contrôlées de palourdes en laboratoire ont mis en évidence qu'aux températures élevées⁹ (21 °C), le développement du dépôt de conchioline est réduit alors que les processus de réparation coquillère sont activés (Paillard et al., 1997). Par ailleurs, les défenses immunitaires de *R. philippinarum* sont nettement améliorées à 21 °C en comparaison à 7 et 13 °C, notamment en ce qui concerne les activités LYS, LAP ainsi que la viabilité et le taux de phagocytose des hémocytes (Paillard et al., 2004a).

Finalement, ces travaux ont conduit à émettre l'hypothèse d'un meilleur statut immunitaire de la palourde aux températures élevées lui permettant de mieux lutter contre le pathogène et donc de réparer les lésions plus facilement.

3.5.2. La salinité a-t-elle une influence sur cette interaction ?

La croissance de *V. tapetis* sur milieu de culture a été évaluée en variant la salinité du milieu de 5 à 60 ‰. Il a ainsi été montré que *V. tapetis* pouvait croître à des salinités très contrastées même si sa croissance la plus élevée est obtenue pour des valeurs de salinités se situant entre 20 et 40 ‰. Suite à ce résultat, les salinités 20, 30 et 40 ‰ ont été sélectionnées pour le challenge infectieux de palourdes par *V. tapetis*. Une augmentation de la CHT, du taux de phagocytose et de l'activité PO a été observée chez les animaux acclimatés à 40 ‰ (Reid et al., 2003).

Cependant, cette amélioration de la condition immunitaire de *R. philippinarum* aux fortes salinités a été corrélée à de faibles prévalences et intensités de la MAB chez les

⁹ Les conditions standards utilisées lors d'une infection contrôlée de *R. philippinarum* par *V. tapetis* sont : T = 14 °C et S = 33 ‰.

animaux témoins et exposés à *V. tapetis*. Reid et al. (2003) suggèrent donc que la salinité est un facteur environnemental ayant un impact plus important que l'exposition à *V. tapetis* sur la réponse immunitaire de *R. philippinarum*.

3.5.3. Influence de la nutrition de l'hôte

Chez des palourdes japonaise exposées à *V. tapetis* en condition de jeûne, il a été observé une augmentation de la prévalence de la MAB ainsi que de son intensité (Plana and Le Pennec, 1991). Par ailleurs, cette étude a également montré l'impact positif d'un système de circulation de l'eau en renouvellement sur la santé des palourdes suite à l'infection par *V. tapetis*.

Par ailleurs, la reprise de nourriture suite à un mois entier de jeûne des animaux induit la réponse de réparation coquillère voire la guérison complète des individus infectés (Plana et al., 1996). Cependant, la reprise de nourriture chez les animaux infectés a été associée à des niveaux de réserves en glycogène relativement bas malgré les phénomènes de guérison constatés. Cette baisse de la réserve en glycogène reflète vraisemblablement un compromis énergétique entre le stockage des réserves suite à la reprise alimentaire et leur utilisation dans les processus immunitaires de lutte contre le pathogène et de réparation des blessures (Flye-Sainte-Marie et al., 2009).

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique et conditionnement

1.1. Expérimentation préliminaire : existe-t-il des variations endogènes des activités SOD, CAT et PO chez *Ruditapes philippinarum* ?

Pour cette expérimentation menée à l'IUEM en collaboration avec Cédric Le Bris, 100 palourdes *R. philippinarum* provenant du même lot de géniteurs nous ont été fournies par la SATMAR depuis leur site d'écloserie à Marennes (Charente-Maritime). Ces individus, calibrés, avaient une taille moyenne de $45,75 \pm 1,73$ mm.

Dès leur arrivée au laboratoire, les animaux ont été placés dans un bac de 100 L rempli d'eau de mer filtrée à $0,5 \mu\text{m}$ et dont le fond était recouvert d'une couche de 10 cm de hauteur de sable fin (0,5 mm) préalablement lavé à l'eau de mer puis autoclavé (Figure 22). L'alimentation en eau était continue et répartie en trois arrivées disposées de façon à ce que chaque partie du bac soit desservie de la même manière. Deux systèmes de bullage assurant une oxygénation continue ont également été placés de part et d'autre du bac pour les mêmes raisons. Une sonde multiparamètres (YSI) a été placée dans le bac afin d'obtenir les mesures de température, de concentration en O_2 et de salinité toutes les 5 min. Ce bac était recouvert d'une bâche opaque lors de l'expérimentation afin de maintenir l'obscurité et éviter toute interférence externe. Les animaux ont été acclimatés dans ces conditions pendant une semaine avant le début des prélèvements.

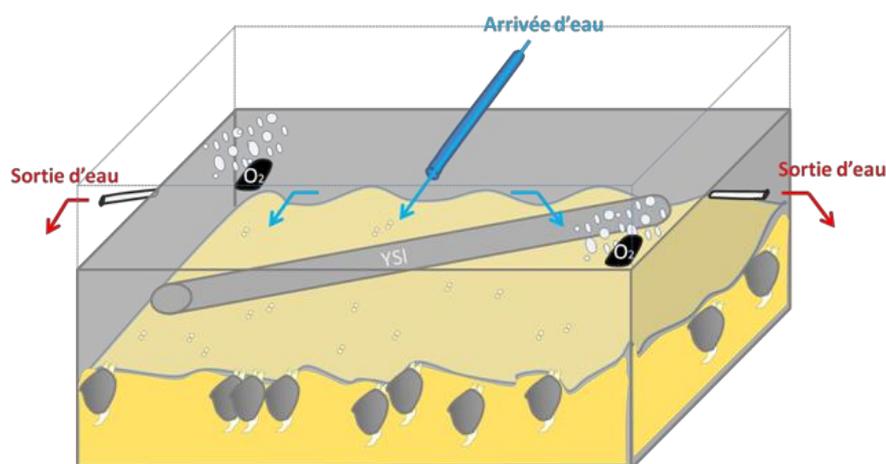


Figure 22 : Schéma du dispositif de l'expérimentation préliminaire

1.2. Expérimentation 1 : effet de la température sur l'interaction *R. philippinarum* – *V. tapetis*

1.2.1. Les palourdes

Pour cette expérimentation menée en collaboration avec Cédric Le Bris, plus de 1100 palourdes *R. philippinarum*, mesurant en moyenne $39,62 \pm 2,29$ mm, ont été récoltées dans l'étang de la SATMAR à l'Île-Tudy le 5 octobre 2012. Après leur transfert au laboratoire à l'IUEM, les animaux ont été répartis dans 18 bacs et acclimatés durant une semaine à 15 °C et 22 °C. Les animaux acclimatés à 22 °C ont été placés dans des bacs de 50 L. Les animaux acclimatés à 15 °C étant plus nombreux pour des besoins d'échantillonnages supplémentaires ont été placés dans des bacs de 75 L. La biomasse de palourdes a été adaptée en fonction de la taille des bacs afin de ne pas introduire un biais imputable à la densité d'animaux dans l'expérimentation.

1.2.2. Souches bactériennes

Pour cette expérimentation, deux souches de *V. tapetis* ont été testées : *V. tapetis* CECT4600 isolée chez *R. philippinarum* au cours des premières mortalités associées à la MAB à Landéda (Paillard et al., 1994, 1995 ; Borrego et al., 1996) et *V. tapetis* LP2 isolée chez le poisson *Symphodus melops* en Norvège en 2003 (Jensen et al., 2003).

Ces souches conservées au -80 °C ont été mises en culture dans 5 mL de milieu Zobell liquide et ont été incubées pendant 12 heures à 18 °C sous agitation constante à 1900 rpm. La composition du milieu Zobell est présentée dans le tableau 2 et les produits ont été fournis par Sigma-Adlrch (France).

Tableau 2 : Composition du milieu de culture Zobell liquide utilisé pour les souches *V. tapetis*

Composition	Contenu en g pour un volume final de 1 L
Pastone	4
Extrait de levure	1
Phosphate ferrique	0,1
Sea Salts	30

La concentration des solutions bactériennes obtenues a été calculée selon la formule suivante : $[Bact] = DO_{490\text{ nm}} \times 1,3 \cdot 10^9 - 3,6 \cdot 10^7$

Où $[Bact]$ est la concentration de la solution bactérienne en UFC (Unité formant une colonie) et $DO_{490\text{ nm}}$ est la densité optique à 490 nm.

1.3. Expérimentation 2 : effet du régime algal et de la maturité sexuelle sur l'interaction *R. philippinarum* – *V. tapetis*

1.3.1. Les palourdes

Pour cette expérimentation, plus de 2000 palourdes *R. philippinarum* ont été pêchées par Fabien Fonteneau, producteur de géniteurs pour la SATMAR à Marennes (EARL claires de Bonsonge), le 5 mai 2014. Ces palourdes âgées de deux ans et provenant du même lot de géniteurs, mesuraient en moyenne $41,49 \pm 1,53$ mm. Sur place, 50 animaux ont été prélevés au hasard afin d'évaluer leur état de santé : indice de condition, prévalence MAB. Après ce diagnostic concluant, puisque la prévalence MAB était nulle, les palourdes ont été transférées dans les installations de l'Ifremer à Plouzané.

Avant de débiter le conditionnement des animaux, ceux-ci ont été mis en quarantaine à leur arrivée. Pour cela, les animaux ont été placés dans un raceway de 300 L muni d'un système d'air-lift permettant la circulation de l'eau en continu. Six balnéations de 24 heures ont été effectuées dans l'eau de mer, filtrée à 1 μm et traitée aux UV, contenant du chloramphénicol, un antibiotique à large spectre, à raison d'une dose de 8 mg/L. Durant ces six journées, une fois par jour l'eau a été entièrement renouvelée et les animaux nettoyés.

Une fois la quarantaine achevée, les animaux ont été répartis dans 18 bacs de 100 L munis de systèmes d'air-lift afin de permettre une utilisation optimale de la nourriture durant l'expérimentation (Figure 23). Le pompage par air-lift consiste en l'injection d'air dans la partie basse d'une canalisation verticale permettant ainsi de faire remonter le liquide s'y trouvant. Cela permet donc dans notre cas la mise en circulation de l'eau et de la nourriture de manière homogène en même temps qu'une oxygénation constante au sein du bac.

Le conditionnement aux deux régimes alimentaires (*T-iso* et *C. calcitrans*) a eu lieu durant 4 semaines avant le challenge par *V. tapetis*. Ce sont donc 9 bacs qui ont été alimentés par un mélange EMSF + *T-iso* et 9 autres par un mélange EMSF + *C. calcitrans*.



Figure 23: Photographie du dispositif utilisé pour l'expérimentation 2

1.3.2. Les micro-algues

Pour cette étude, deux micro-algues de fourrage, couramment utilisées en aquaculture et présentant des profils en acides gras très contrastés, ont été cultivées : *Isochrysis affinis galbana*, clone Tahiti (*T-iso*) et *Chaetoceros calcitrans*.

1.3.2.1. Milieu de culture

Pour la culture des deux algues, le milieu de culture de Conway a été utilisé à chaque fois. Sa composition est donnée dans le tableau 3. Elle consiste en la préparation d'une solution principale contenant les sels nutritifs nécessaires à la croissance des algues, à laquelle est ajoutée une solution contenant des traces de métaux et enfin une autre solution contenant des vitamines. Les produits utilisés pour ces milieux ont été fournis par Sigma-Aldrich.

De plus, pour la culture de la diatomée *C. calcitrans*, une solution contenant des métasilicates (à raison de 40 mg/L) a été ajoutée au milieu de Conway.

Tableau 3 : Composition du milieu de Conway**Solution principale**

Composition	Contenu pour 1 L d'eau distillée
Na ₂ EDTA	45 g
NaNO ₃	100 g
H ₃ BO ₃	33,6 g
NaH ₂ PO ₄	20 g
MnCl ₂ , 4 H ₂ O	0,36 g
FeCl ₃ , 6H ₂ O	1,3 g
+ Traces de métaux	1 mL

Solution traces de métaux

Composition	Contenu pour 100 mL d'eau distillée
ZnCl ₂	2,1 g
CoCl ₂ , 6H ₂ O	2 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ (O ₂) ₄ , 4H ₂ O	0,9 g
CuSO ₄ , 5H ₂ O	2 g

Solution vitaminique

Composition	Contenu pour 100 mL d'eau distillée
Vit B ₁	200 mg
Vit B ₁₂	10 mg

Dosage : 0,1 mL/L de milieu de culture

1.3.2.2. Cycle de production

La culture des micro-algues a été effectuée à partir de cultures souches maintenues en état dans des erlenmeyers de 250 mL par Philippe Miner à Ifremer, Plouzané. Pour les deux algues, une première étape dans la culture consiste à ensemercer un erlenmeyer de 250 mL avec la culture souche, servant à maintenir la culture souche, et un ballon de 2 L, servant comme culture mère pour les ensemencements suivants. Les étapes qui suivent

diffèrent selon l'algue considérée étant donné que *T-Iso* a été cultivée en système semi-continu et *C. calcitrans* a été cultivée en « batch ».

Une fois la culture mère de *T-Iso* arrivée en phase de croissance exponentielle (4 jours post ensemencement), elle est mise en culture dans un ballon de 6 L. Une bombonne de 10 L alimente ce ballon avec du milieu de culture à l'aide de pompes péristaltiques. Un second ballon de 6 L connecté au premier permet de récolter les cellules micro-algales les plus avancées dans le cycle de croissance de l'algue. Cette récolte tous les 2 à 4 jours donne son nom au système qui est qualifié de semi-continu puisque les récoltes sont périodiques. La récolte est utilisée pour ensemer un cylindre de 200 L qui permet la production d'algues en quantité suffisante pour alimenter les palourdes.

De la même manière que pour la culture de *T-iso*, la culture mère de *C. calcitrans* arrivée en phase de croissance exponentielle est ensemencée dans un ballon de 6 L contenant du milieu de culture. C'est ce ballon qui sera utilisé pour ensemer à son tour un cylindre de 200 L.

Enfin, les concentrations algales sont évaluées pour chaque algue à chaque cycle de production par comptage sur cellule de Malassez et la quantité d'algues apportée aux palourdes est ajustée pour fournir un nombre précis de cellules/animal/jour.

1.3.3. Les bactéries

La souche bactérienne utilisée pour cette expérimentation était *V. tapetis* CECT4600^T, isolée à Landéda en 1990 (Paillard et al., 1994, 1995, Borrego et al., 1996). Cette souche conservée au -80 °C a été cultivée en milieu Zobell par étalement sur plusieurs boîtes de pétri (tableau 4). Les boîtes ont ensuite été incubées pendant 24 heures à 18 °C. Puis, le jour des injections, les colonies ont été reprises dans l'EMSF et les concentrations bactériennes ont été calculées de la même manière que présenté en 1.2.2.

Tableau 4 : Composition du milieu de culture Zobell solide utilisé pour la culture de *V. tapetis*

Composition	Contenu en g pour un volume final de 1 L
Pastone	4
Extrait de levure	1
Phosphate ferrique	0,1
Sea Salts	30
Agar	15

2. Design expérimentaux et plans d'échantillonnage

2.1. Expérimentation préliminaire

L'objectif de cette étude était de savoir si, sans aucune stimulation des palourdes, les activités de la PO et d'enzymes antioxydantes (SOD et CAT) étaient soumises à des variations endogènes telles que les cycles circadiens (24h) ou circatidaux (12,4h).

Le design expérimental de cette expérimentation était relativement simple puisqu'aucun challenge expérimental n'a été effectué sur les animaux. Ainsi, 100 palourdes ont été placées dans un bac sans réplication, celle-ci étant constituée par le nombre d'individus prélevés à chaque temps.

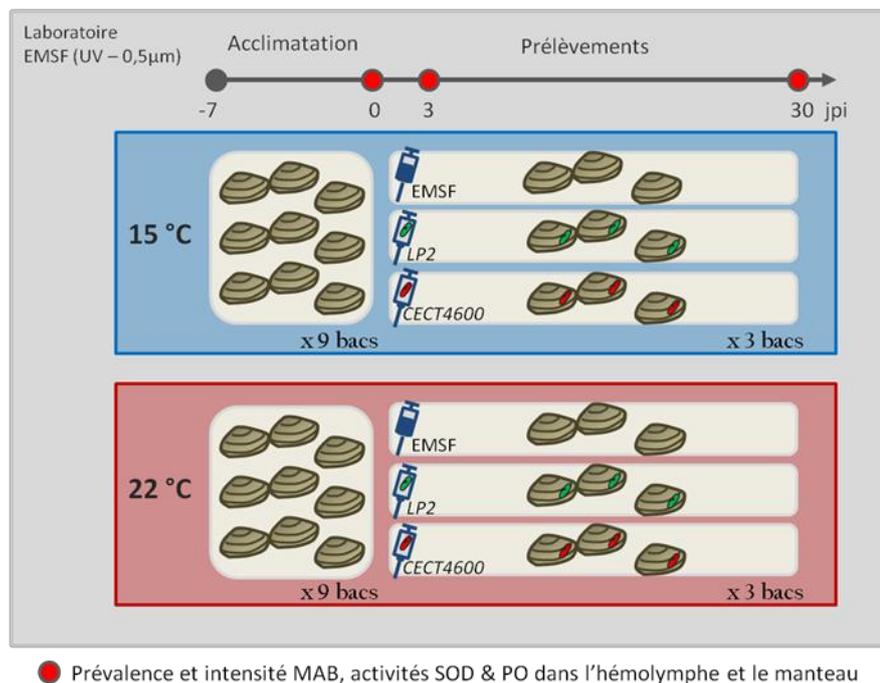
Les échantillonnages se sont déroulés sur 3 journées entières¹⁰. Chaque jour, 3 palourdes ont été prélevées toutes les 3 heures. À chaque prélèvement, la bâche opaque était relevée et, les palourdes, repérées grâce à leurs siphons apparaissant à la surface du sable, étaient retirées à l'aide d'une pince. Sur chacune des palourdes, l'hémolymphe et les branchies ont été prélevées afin de mesurer d'activités PO, SOD et CAT. Le diagnostic de la MAB a par ailleurs été effectué sur les coquilles de ces animaux.

¹⁰ Afin de confirmer l'existence d'un cycle endogène, il est nécessaire de le voir se répéter 3 fois au minimum.

2.2. Expérimentation 1

Les objectifs de l'expérimentation 1 étaient de caractériser l'effet de la température sur (1) le développement de la MAB suite à une infection de palourdes par deux souches de *V. tapetis* et (2) la réponse immunitaire et antioxydante de *R. philippinarum* exposée à deux souches de *V. tapetis*.

Pour chacune des conditions d'acclimatation thermique (15 °C : 9 bacs et 22 °C : 9 bacs) : un tiers des palourdes (3 bacs) a été injecté avec une solution de *V. tapetis* CECT4600 (100 µL à 10⁶ UFC/mL) ; un second tiers (3 bacs) a été injecté avec une solution de *V. tapetis* LP2 (100 µL à 10⁶ UFC/mL) ; et le dernier tiers a été injecté avec 100 µL d'EMSF, constituant ainsi le groupe témoin (Figure 24). Ces injections ont été effectuées dans l'espace extrapalléal afin d'obtenir un développement de la MAB relativement rapide en comparaison aux autres modes d'injections.



● Prévalence et intensité MAB, activités SOD & PO dans l'hémolymphe et le manteau
Figure 24 : Design expérimental de l'expérimentation 1
Abréviations : jpi, jours post-injection ; EMSF, eau de mer filtrée stérile ;
LP2 et CECT4600 correspondent aux souches de *V. tapetis* utilisées

Pour cette expérimentation, 3 temps de prélèvement ont été choisis afin de caractériser les réponses de *R. philippinarum* à court et à long terme : 0 (avant injection), 3 et 30 jours post-injection ou jpi. À chacun de ces temps, 5 individus ont été prélevés par bac (15 au total par condition). L'effet des différentes conditions sur l'interaction hôte-

pathogène a été étudié individuellement au travers de la prévalence et l'intensité de la MAB. De plus, la réponse immunitaire de *R. philippinarum* a été évaluée par l'analyse des activités PO et SOD dans l'hémolymphe et dans le manteau des animaux.

2.3. Expérimentation 2 : étude individuelle

Les objectifs de cette étude était d'évaluer (1) l'effet de régimes mono-algaux et (2) l'effet du statut de reproduction de l'animal sur le développement de la MAB et les réponses immunitaires de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis*.

Pour chaque condition de nutrition (*T-Iso* : 9 bacs et *C. calcitrans* : 9 bacs), un tiers des animaux (3 bacs) a été injecté avec 100 μ L d'une solution de *V. tapetis* CECT4600 (10^7 UFC/mL¹¹); un second tiers (3 bacs) a été injecté avec 100 μ L d'EMSF constituant ainsi le « témoin injection »; le dernier tiers (3 bacs) n'a pas été injecté du tout constituant ainsi un « témoin sans injection » (Figure 25). Ce dernier groupe témoin a permis de tester l'effet injection seul.

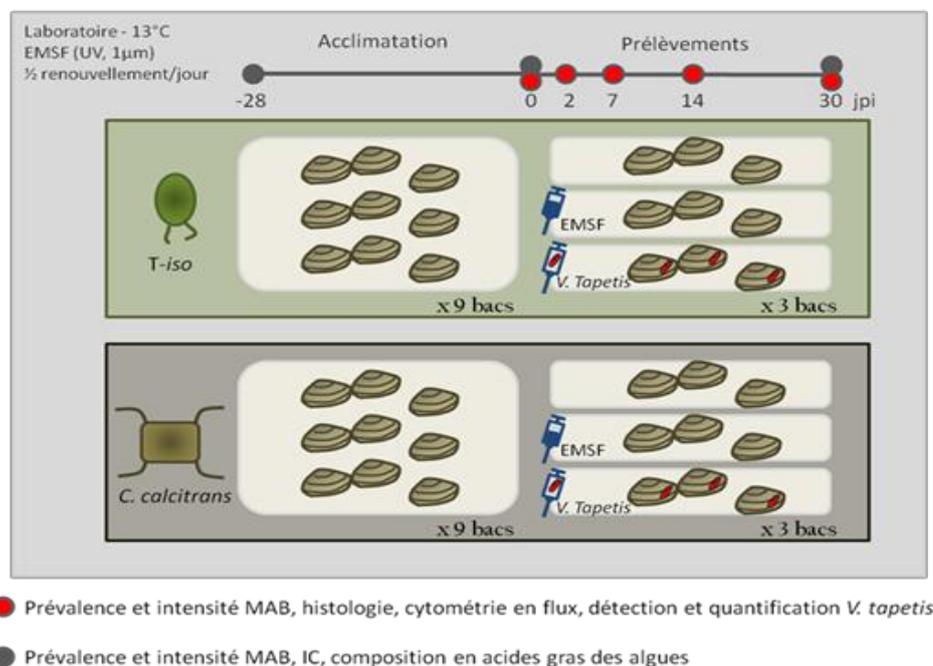


Figure 25 : Design expérimental de l'expérimentation 2 – étude individuelle

¹¹ Pour l'expérimentation 2, nous avons choisi d'injecter une dose de *V. tapetis* supérieure à celle utilisée pour l'expérimentation 1 afin de s'assurer du développement de signes cliniques de la MAB sur les animaux. En effet, étant donné les conditions expérimentales choisies pour cette expérimentation, nous nous attendions à obtenir des intensités de maladie bien plus faibles que dans le cas de l'expérimentation 1 comme l'ont montré les travaux de Plana & Le Penec (1991).

Etant donné le nombre conséquent de palourdes à injecter (1200), une première moitié des animaux au sein de chaque bac a été injectée sur une journée et l'autre moitié le lendemain. Des séparations physiques ont donc été placées au sein de ces bacs afin de bien repérer chaque groupe de palourdes pour les prélèvements. Pour cette étude, 5 temps de prélèvement ont été choisis : 0 (avant injection), 2, 7, 14 et 30 jpi. Etant donné que les temps d'injection ont été dédoublés, il en a été de même pour les temps de prélèvement. Ainsi, à chaque temps de prélèvement, 10 palourdes ont été prélevées par bac (5 le premier jour et 5 le second jour). Pour chaque palourde prélevée, les analyses suivantes ont été faites :

- prévalence et intensité MAB ;
- détermination du sexe et de la maturité sexuelle ;
- paramètres hématocytaires (taux de phagocytose, viabilité hématocytaire, production d'espèces réactives de l'oxygène – ERO) ;
- détection et quantification de *V. tapetis* dans les fluides extrapalléaux.

De plus, les analyses complémentaires suivantes ont été réalisées juste avant le conditionnement aux algues, 4 semaines après ce conditionnement et 30 jpi :

- prévalence et intensité MAB ;
- indices de condition ;
- composition en acides gras neutres des algues.

2.4. Expérimentation 2 : sous-échantillonnage et étude par pool

Les objectifs de cette expérimentation étaient d'évaluer l'effet de la qualité du régime alimentaire de la palourde sur (1) la composition de ses réserves énergétiques et sur le métabolisme énergétique associé, (2) sa réponse immunitaire et antioxydante suite à une exposition par *V. tapetis*.

À l'issue de l'étude individuelle menée sur l'expérimentation 2, un sous-échantillonnage des individus a donc été effectué pour étudier les réponses physiologiques des animaux de manière plus ciblée. Ainsi, seuls les individus associés aux conditions d'injection EMSF et *V. tapetis* ont été sélectionnés pour chaque traitement algal à 2, 7 et 30 jpi. Afin d'analyser un maximum de variables physiologiques, nous avons décidé de faire une étude par pool, ce qui a nécessité de prendre en compte d'autres facteurs comme le sexe, la

maturité sexuelle et l'occurrence de la MAB des palourdes. Etant donné que notre population expérimentale d'animaux était représentée par une plus grande proportion de mâles matures (ratio 1,5 : 1,0), nous avons choisi de n'utiliser que ces individus pour la constitution des pools dans un souci de représentativité de l'échantillonnage. Un autre critère pour l'établissement des pools était l'occurrence de la MAB puisque selon le temps de prélèvement considéré, ce paramètre évolue. Les individus injectés avec *V. tapetis* sont classés MAB+ si des signes cliniques de la MAB sont présents et MAB- si aucun signe clinique n'est observé. Pour les individus injectés avec l'EMSF, seuls les animaux sains ont été sélectionnés et sont donc classés comme témoins. Finalement, chaque pool regroupait 2 à 4 animaux d'un même bac et conservait la même contribution de chaque individu au pool sur la base de leur poids (Tableau 5).

Tableau 5 : Tableau récapitulatif de la constitution des pools selon le régime algal, l'injection, l'occurrence de la MAB, et le temps de prélèvement.

Abréviations : P = numéro du pool, n = nombre d'individus par pool et B = numéro du bac.

Conditions			Temps (jpi)				
Algue	Injection	MAB	2	7	30		
<i>C. calcitrans</i>	EMSF	Témoins	P1 n=3 B4	P1 n=2 B4	P1 n=2 B4		
			P2 n=3 B4	P2 n=2 B5	P2 n=3 B5		
			P3 n=3 B5	P3 n=3 B5	P3 n=4 B6		
			P4 n=3 B6	P4 n=3 B6	P4 n=3 B6		
	<i>V. tapetis</i>	MAB-		P1 n=3 B1			
				P2 n=3 B2			
				P3 n=3 B3			
		MAB+				P1 n=3 B1	
						P2 n=3 B2	P1 n=3 B1
						P3 n=4 B2	P2 n=3 B2
						P4 n=3 B3	P3 n=4 B3
						P5 n=3 B3	
<i>T-Iso</i>	EMSF	Témoins	P1 n=3 B13	P1 n=2 B13			
			P2 n=3 B14	P2 n=3 B14	P1 n=3 B14		
			P3 n=3 B14	P3 n=4 B15	P2 n=3 B15		
			P4 n=3 T15				
	<i>V. tapetis</i>	MAB-		P1 n=3 T10			
				P2 n=3 T10	P1 n=2 T10		
				P3 n=5 T11	P2 n=2 T10		
				P4 n=3 T12			
		MAB+				P1 n=3 T11	P1 n=5 T10
						P2 n=3 T12	P2 n=4 T11

3. Prélèvements

3.1. Prélèvement des fluides

3.1.1. Hémolymphe

Pour toutes les expérimentations décrites précédemment, l'hémolymphe des animaux a été prélevée en insérant une seringue stérile 1 mL équipée d'une aiguille stérile 25 G au niveau du muscle adducteur postérieur (Figure 26A). De manière générale, environ 1 mL d'hémolymphe peut être récolté par palourde.

Pour l'expérimentation préliminaire et l'expérimentation 1, une fois prélevée, l'hémolymphe a directement été centrifugée à 785 g à 4 °C pendant 10 min. Le surnageant obtenu (fraction acellulaire de l'hémolymphe) a été aliquoté dans des microtubes et conservé au -80 °C jusqu'à son utilisation pour les dosages enzymatiques et protéiques.

Pour l'expérimentation 2, suite au prélèvement, la qualité de celui-ci est vérifiée par observation au microscope optique (objectif X 10) (figure 26B). Puis, les seringues contenant l'hémolymphe sont ensuite conservées sur glace jusqu'aux analyses de cytométrie en flux afin de limiter au maximum l'agglutination des cellules entre elles.

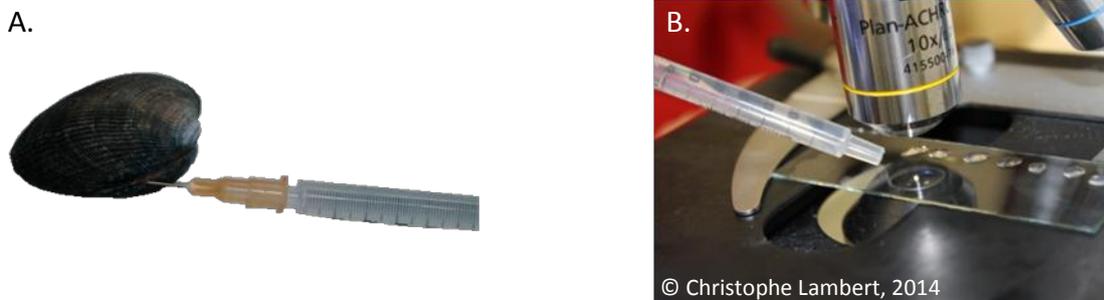


Figure 26 : A. Prélèvement de l'hémolymphe chez *R. philippinarum* – B. Vérification de la qualité du prélèvement d'hémolymphe au microscope.

3.1.2. Fluides extra-palléaux

Dans le cadre de l'expérimentation 2, les fluides extrapalléaux ont été prélevés afin d'y quantifier la charge bactérienne.

Après ouverture de la coquille, l'animal est placé « siphons vers le haut » afin d'évacuer au maximum les fluides palléaux. Puis, une seringue stérile 1 mL équipée d'une aiguille stérile 25 G préalablement recourbée est insérée sous les siphons, entre la coquille

et le manteau de l'animal (Figure 27). Selon l'individu, la quantité de fluides prélevés est variable mais de manière générale, 500 µL sont prélevés par animal. Les fluides sont ensuite placés dans des microtubes et congelés immédiatement à l'azote liquide, puis conservés au -80 °C avant analyse.



Figure 27 : Prélèvement des fluides extrapalléaux chez *R. philippinarum*

3.2. Prélèvement des organes

Les branchies, le manteau, la glande digestive et les gonades des palourdes ont été disséqués sur glace puis congelés en azote liquide avant d'être conservés au -80 °C. Les échantillons de gonades ont été placés dans des cassettes d'inclusion qui ont été plongées immédiatement dans une solution de Davidson modifiée (Tableau 6). Après 48h dans ce mélange, les cassettes ont été placées dans de l'éthanol 70 % jusqu'à la préparation des échantillons pour l'analyse histologique.

Tableau 6: Composition de la solution de Davidson modifiée

Composition	Volume (mL) pour 1 L de solution
Eau milliQ	500
Formaldéhyde 40 %	300
Ethanol absolu	150
Acide acétique glacial (ajouté extemporanément)	50

4. Indices de condition

L'indice de condition (IC) a été calculé comme le rapport entre le poids sec de la chair et le poids sec de la coquille (Lucas and Beninger, 1985).

5. Cytométrie en flux

Dans le cadre de l'expérimentation 2, des mesures de viabilité, de concentration, de taille, de complexité et de production d'ERO des hémocytes de *R. philippinarum* ont été réalisées à l'aide d'un cytomètre en flux FACScalibur (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA). La phagocytose des hémocytes des palourdes ont, quant à elles, été réalisées à l'aide d'un cytomètre en flux FACSverse (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA). Chaque mesure individuelle a ensuite été analysée en utilisant le logiciel BD FACSuite™. Toutes ces mesures ont été menées de manière individuelle.

5.1. Concentration, viabilité, taille et complexité des hémocytes

Pour ces différentes mesures, 100 µL d'hémolymphe préalablement filtrée sur soie (80 µm) sont transférés dans un tube contenant 200 µL d'une solution anti-agrégante pour les hémocytes et 100 µL d'EMSF (Auffret and Oubella, 1995). Ce mélange est ensuite incubé dans le noir pendant 2 h à 18 °C avec deux sondes fluorescentes : le SYBR Green et l'Iodure de Propidium (IP). Le SYBR Green est un intercalant des acides nucléiques à double brin et peut entrer dans les cellules vivantes ou mortes. Par contre, l'IP entre uniquement dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, *i.e.*, considérées comme étant mortes.

Après l'incubation avec les deux sondes, l'analyse par cytométrie en flux permet d'estimer le pourcentage de cellules fluorescentes rouges (ayant incorporé l'IP *i.e.*, cellules mortes) grâce au détecteur FL1 du cytomètre (530/30 nm) par rapport au nombre total de cellules fluorescentes vertes (ayant incorporé le Sybr-green, *i.e.*, cellules vivantes et cellules mortes) grâce au détecteur FL3 du cytomètre (> 670 nm, long pass) (Delaporte et al., 2003; Lambert et al., 2007a; Haberkorn et al., 2010). Les résultats sont exprimés en % d'hémocytes morts.

La concentration hémocytaire totale, exprimée en hémocyte par mL d'hémolymphe circulante correspond au nombre de cellules qui fluorescent avec le SYBR Green.

Enfin, les valeurs du Forward Scatter (FSC) et la donnée du Side Scatter (SSC), permettent de caractériser la taille et la complexité relative des hémocytes (exprimées en unités arbitraires).

5.2. Taux de phagocytose

Pour les mesures associées au processus de phagocytose, 100 μ L d'hémolymphe préalablement filtrée sur soie (80 μ m) ont été dilués avec 100 μ L d'EMSF. Ce mélange a été incubé pendant 2 heures à 18 °C dans le noir avec 30 μ L d'une solution contenant des billes qui fluorescent dans le vert. Suite à l'incubation, la phagocytose est stoppée en disposant les tubes sur la glace.

L'analyse au cytomètre permet de mesurer (détecteur FITC du cytomètre, 527/32 nm) la fluorescence verte moyenne des hémocytes (liée à la quantité de billes phagocytées) permettant de calculer le taux de phagocytose comme le pourcentage d'hémocytes actif contenant 3 billes ou plus par rapport au nombre total d'hémocytes (Delaporte et al., 2003, 2006; Haberkorn et al., 2010). Des mesures préalables ont en effet permis de montrer qu'à partir de 3 billes par hémocyte, il y a environ 100% de chance qu'au moins une bille ait été internalisée (ce qui permet d'éviter la surestimation du taux de phagocytose lié à des billes collées à la surface des hémocyte sans être internalisées).

5.3. Production d'ERO

Pour les mesures de production d'espèces réactives de l'oxygène, 100 μ L d'hémolymphe préalablement filtrée sur soie (80 μ m) ont été dilués avec 300 μ L d'EMSF. Ce mélange a été incubé durant 2 heures à 18 °C dans le noir après ajout de 4 μ L du fluorochrome DCFH-DA 1 mM (Sigma # D6883). Sous l'action d'ERO telles que H_2O_2 , O_2^- ou encore $ONOO^-$, le DCFH piégé dans la cellule, est oxydé en DCF hautement fluorescent (vert). Le niveau de fluorescence (mesuré par le détecteur FL1 du cytomètre 530/30 nm) est directement proportionnel à la production d'ERO dans la cellule (Lambert et al., 2003, 2007b). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U.A.).

6. Histologie : sexage et détermination des stades de maturité

6.1. Préparation des échantillons

Inclusion

Les échantillons vont d'abord subir une déshydratation par passage dans des bains successifs d'alcool de degré croissant. Un passage dans des bains contenant un agent clarifiant permettra d'évacuer les reliquats d'alcool présents puis les échantillons seront paraffinés (Tableau 7). Toutes ces étapes de bains successifs ont été réalisées à l'aide d'un automate d'inclusion programmable. Les différents produits utilisés ont été fournis par CML (France) et Sigma-Aldrich (France).

Tableau 7 : Etapes de déshydratation, clarification et paraffinage des échantillons

Bain	Temps de passage
Alcool 80 %	1 h
Alcool 95 %	2 h
Alcool 95 %	2 h
Alcool 95 %	1 h
Alcool 100 %	2 h
Alcool 100 %	2 h
Alcool 100 %	1 h
Claral®	1 h
Claral®	2 h
Paraffine	1 h
Paraffine	1 h
Paraffine	2 h

Enfin, l'aide d'une station d'enrobage, de la paraffine est coulée sur le morceau de gonade paraffiné, préalablement retiré de la cassette d'inclusion et placé dans un moule en aluminium donnant la forme du futur bloc. Après refroidissement, les blocs sont démoulés et peuvent être conservés au réfrigérateur avant la coupe de ceux-ci.

Coupe au microtome

Le bloc de paraffine contenant la gonade est ensuite placé sur le microtome. Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées, le ruban obtenu est placé dans un bain marie à 41 °C afin d'obtenir une coupe sans plis. Puis, à l'aide d'un pinceau, les rubans sont délicatement déposés sur les lames de microscope, qui sont incubées à 37 °C pendant une nuit pour que les coupes adhèrent bien aux lames.

6.2. Colorations et montage

La coloration des coupes a ensuite été réalisée avec l'hématoxyline de Harris, un colorant nucléaire basique, et l'éosine Y, un colorant cytoplasmique acide. Ainsi, les noyaux sont colorés en violet à bleu et les cytoplasmes en rose à rouge. Pour ce faire, les lames ont été placées sur des porte-lames qui vont être baignés dans les différents bains décrits dans la Tableau 8. Les différents produits utilisés ont été fournis par CML (France).

Tableau 8 : Bains successifs et temps de passage des échantillons lors de la coloration

Bain	Temps de passage
Claral®	5 min
Claral®	5 min
Ethanol 100 %	5 min
Ethanol 100 %	5 min
Ethanol 96 %	5 min
Ethanol 70 %	5 min
Eau distillée	5 min
Hématoxyline	1 à 3 min
Eau courante	3 min
Eosine	5 à 7 min
Ethanol 96 %	5 min
Ethanol 100 %	5 min
Claral®	5 min
Claral®	5 min

Le montage entre lame et lamelle a été effectué à l'aide d'une résine de type Eukitt qui polymérise à température ambiante.

6.3. Analyse qualitative au microscope optique

Une fois les lames sèches, une analyse au microscope optique visant à déterminer le sexe et le stade de maturité de chaque individu est réalisée selon la nomenclature établie chez *R. philippinarum* par Drummond et al. (2006). Celle-ci est résumée dans le tableau 9.

Tableau 9 : Nomenclature et description des stades de maturité en fonction du sexe chez *Ruditapes philippinarum* (Drummond et al., 2006).

Males		Femelles	
Stade 0 : Repos	Gonade constituée de tissu conjonctif – sexe non distinguable	Stade 0 : Repos	Gonade constituée de tissu conjonctif – sexe non distinguable
Stade 1 : Développement précoce	Prolifération de la gonade – follicules avec spermatogonies se développant au niveau de leur paroi, présence de spermatozoïdes	Stade 1 : Développement précoce	Prolifération de la gonade – augmentation du nombre d’ovogonies dans les parois des follicules – petits ovocytes en développement
Stade 2 : Développement tardif	Coexistence de spermatogonies, spermatozoïdes, spermatozoïdes et spermatozoïdes au sein des follicules	Stade 2 : Développement tardif	Moins de la moitié des ovocytes en développement sont libres dans le lumen – ovocytes en développement attachés à la paroi des follicules
Stade 3 : Maturité	Spermatozoïdes essentiellement au sein des follicules, leur flagelle étant dirigé vers le lumen – formations concentriques caractéristiques	Stade 3 : Maturité	La plupart des ovocytes sont matures et libres dans le lumen des follicules
Stade 4 : Ponte partielle	Spermatozoïdes très visibles avec leur forme caractéristique « tournoyante » – possibilité d’observer des espaces vides dus à la libération de gamètes	Stade 4 : Ponte partielle	Nombre d’ovocytes matures par follicule largement diminué – possibilité d’observer des espaces vides dus à la libération de gamètes
Stade 5 : Ponte & dégénérescence	Parois des follicules détruites et follicules vidés – chez les individus aux stades les plus avancés, spermatozoïdes résiduels et présence d’hémocytes	Stade 5 : Ponte & dégénérescence	Parois des follicules détruites et follicules vidés – chez les individus aux stades les plus avancés, ovocytes matures résiduels et présence d’hémocytes

7. Diagnostic de la maladie de l'anneau brun

7.1. Qualitativement : *via* l'observation des signes cliniques et l'utilisation d'une clé de détermination

Les stades de développement du dépôt de l'anneau brun ou stades de dépôt de conchioline (CDS : « Conchyolin Deposit Stages ») sont déterminés par observation à la loupe binoculaire selon la clé de détermination mise en place par Paillard and Maes (1994). Cette classification repose sur le calcul d'indice reliant à la fois l'étendue (19 stades) et l'épaisseur (4 stades) de l'anneau brun sur la coquille de l'animal. L'association de ces indices aboutit à la caractérisation de 7 CDS (Figure 28).

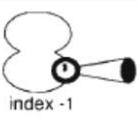
STAGE 1 (index -19 to -1)	 index -1 <p style="text-align: right;">Visible only under the microscope</p>			
STAGE 2 (index 0 to 2)	 index 1	 index 2	 index 2	 index 2
STAGE 3 (index 3 to 4)	 index 3	 index 4	 index 4	 index 4
STAGE 4 (index 5 to 6)	 index 5	 index 6	 index 5	 index 6
STAGE 5 (index 7 to 8)	 index 7	 index 8	 index 8	
STAGE 6 (index 9 to 10)	 index 9	 index 10	 index 10	
STAGE 7 (index 11 to 19)	 index 11	 index 12	 index 14	 index 18

Figure 28 : Clé de détermination des signes cliniques associés à la MAB chez *Ruditapes philippinarum*, établie par Paillard & Maes (1994).

Puis, 5 stades de réparation coquillère (SRS : « Shell Repair Stages ») ont été définis comme suit :

- SRS 0 où la coquille de l'individu malade n'a pas été réparée
- SRS 1 où les dépôts de conchioline sont recouverts par de petits points de calcification
- SRS 2 où des plaques calcifiées recouvrent les dépôts de conchioline
- SRS 2,5 où les dépôts de conchioline sont entièrement recalifiés sauf pour quelques points de conchioline toujours apparents
- SRS 3 où la coquille est « entièrement réparée »

Cette méthode de diagnostic a été utilisée pour l'expérimentation préliminaire et l'expérimentation1.

7.2. Quantitativement : *via* l'analyse d'images

Pour l'expérimentation 2, une autre méthodologie a été développée dans le but d'obtenir une variable qui soit quantitative. Les coquilles ont été photographiées au moyen d'un appareil CANON-50 mm muni d'un objectif macroscopique. Ces photographies ont ensuite été traitées à l'aide du logiciel de traitement d'image Visilog 6.6. Ainsi, les surfaces de coquille entière (S_C), d'anneau brun (S_{AB}) et de réparation coquillère (S_{RC}) ont été mesurées pour chaque individu (Figure 29A et 29B). Cette méthode avait déjà été utilisée par Paillard and Maes (1994) mais cette fois, un nouvel indice a été ajouté en ce qui concerne la réparation de la coquille. Ces mesures de surface ont permis de définir les indices suivants :

$$ISD = \frac{S_{AB}}{S_C} * 100$$

$$IRC = \frac{S_{RC}}{S_{AB}} * 100$$

Avec S_{AB} , la surface du dépôt de conchioline, S_C , la surface de la coquille et S_{RC} , la surface de coquille réparée. L'ISD représente l'indice de surface du dépôt de l'anneau brun et l'IRC, l'indice de réparation coquillère en tant que surface d'anneau brun réparé.

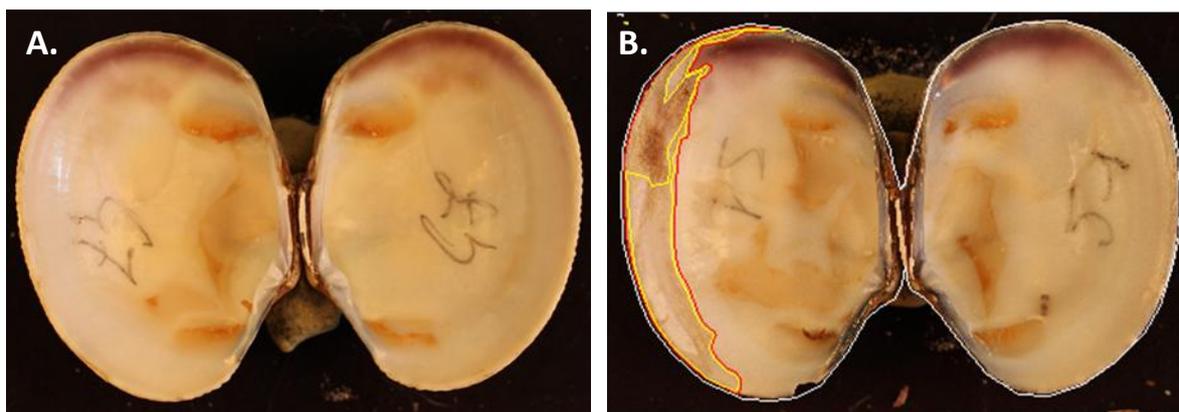


Figure 29 : Exemples d'images obtenues pour une coquille de *R. philippinarum* saine (A) et une coquille présentant des signes cliniques de la MAB (B). Les zones entourées d'un liseré blanc, rouge et jaune représentent respectivement les surfaces de coquille, d'anneau brun et de réparation coquillère.

Cette méthodologie présente tout de même un biais résidant dans la prise en compte de la concavité de la coquille. Cependant, les animaux que nous avons sélectionnés pour l'expérimentation 2 sont des animaux calibrés en termes de poids, de taille. Nous avons donc supposé ce biais négligeable dans le calcul des différents indices présentés ci-dessus.

7.3. Prévalence et intensité de la MAB

Les paramètres évalués lors du diagnostic de la MAB permettent d'avoir accès à la prévalence de la maladie, celle-ci étant définie comme la proportion d'individus ayant développé des signes cliniques de la MAB par rapport à la population expérimentale de palourdes à un temps donné. L'intensité de la maladie, quant à elle, peut être caractérisée par la valeur associée au développement de l'anneau brun (CDS, ISD).

8. Dosages biochimiques

8.1. Protéines

8.1.1. Extraction des protéines

Les différents organes prélevés (branchies, glande digestive ou manteau) ont été broyés à l'aide d'un broyeur à bille Retsch MM 400 sous azote liquide : la poudre obtenue est pesée pour chaque échantillon et conservée à -80 °C jusqu'à l'extraction.

Les poudres ont ensuite été homogénéisées au moyen d'un disperseur/homogénéisateur (ultra-turrax®) dans une solution tampon à raison d'un rapport poids : volume de 1 : 5, i.e., 50 mg de poudre pour 250 µL de tampon.

Après l'homogénéisation, les échantillons ont été centrifugés à 1000 g pendant 10 min à 4 °C afin d'éliminer la fraction lipidique des échantillons. Suite à une seconde centrifugation à 10000 g pendant 45 min à 4 °C, le surnageant protéique est récupéré et stocké dans des microtubes à -80 °C.

Par ailleurs, deux tampons de lyse protéique ont été utilisés sur des échantillons tests¹² lors des mises au point de protocoles pour les enzymes antioxydantes. Ces comparaisons avaient pour but de choisir le tampon le plus adapté ainsi que la dilution de travail à utiliser pour chaque protocole. La composition des deux tampons (« BLOT » et « PBS ») est donnée dans les tableaux 10 et 11.

Tableau 10 : Composition du tampon « BLOT »

Produit	Fournisseur	Masse molaire (g/mol)	Concentration	Quantité pour 500mL de tampon
NaCl	Sigma	58,44	150 mM	4,383 g
Tris HCl	Sigma	157,6	10 mM	0,788 g
EDTA	Sigma	372,3	1 mM	0,186 g
EGTA	Sigma	380,4	1 mM	0,190 g
Phosphatase inhibitor cocktail II	Sigma			5 mL
Triton X100	Sigma		1 %	5 mL
CA-630 Igepal	Sigma		0,5 %	2,5 mL
Eau milliQ				Qsp 500 mL
Ajuster le pH à 7.4				
Complete EDTA free Protease inhibitor cocktail	Roche	Ajouter extemporanément 1 tablette pour 25 mL de tampon		

¹² Ces échantillons sont issus de palourdes n'ayant pas été stimulées expérimentalement.

Tableau 11 : Composition du tampon « PBS »

Produit	Fournisseur	Poids moléculaire	Concentration	Quantité pour 200 mL de tampon
PBS	Sigma		10 mM	1 Tablette
EDTA	Sigma	372,3	1 mM	0,0745 g
Triton X100	Sigma		0,1 %	0,2 mL
Eau milliQ				Qsp 200 mL

8.1.2. Dosages des protéines

La concentration en protéines a été évaluée par dosage spectrophotométrique en microplaque 96 puits à fond plat (Greiner) selon la méthode de (Bradford, 1976). Ces dosages ont été effectués à l'aide du kit Bio-Rad Protein Assay (Bio Rad, France) en utilisant le réactif contenant le bleu de Coomassie se liant essentiellement aux résidus basiques et aromatiques des acides aminés.

Brièvement, 200 μ L du réactif fourni avec le kit sont ajoutés à 10 μ L de surnageant protéique de l'échantillon considéré. De plus, une gamme étalon a été réalisée à partir d'albumine de sérum bovin (BSA) diluée dans de l'eau milliQ avec des concentrations allant de 0,031 à 1 mg/mL. Deux blancs ont été réalisés, l'un contenant de l'eau milliQ (blanc de la gamme) et l'autre contenant le tampon d'extraction protéique utilisé pour l'échantillon (blanc échantillon). Tous les dosages ont été effectués en triplicata. Après une incubation à 20 °C durant 30 minutes, l'absorbance des échantillons a été mesurée à une longueur d'onde $\lambda = 620$ nm. Les résultats de concentrations en protéines ont ensuite été exprimés en mg/mL afin de calculer les activités spécifiques des enzymes et en mg/g de poids frais pour le contenu biochimique en protéines.

8.2. Dosages enzymatiques

A l'exception de la catalase (CAT) dont l'activité enzymatique a été déterminée dans des cuvettes en quartz, toutes les activités enzymatiques ont été mesurées dans des microplaques 96 puits à fond plat (Greiner, France). Les mesures d'absorbances ont été

effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre à cuve (Libra S12, Biochrom pour les expérimentations préliminaires et 1; Uvikon 941, Kontron Instruments pour l'expérimentation 2 et d'un spectrophotomètre lecteur de microplaque (POLARstar Omega, BMG Labtech pour les expérimentations préliminaires et 1; Synergy HT, Biotek pour l'expérimentation 2. Chaque échantillon a été testé en triplicata pour chaque dosage enzymatique, à l'exception de l'activité CAT qui a été mesurée en duplicata. Par ailleurs, tous les produits chimiques utilisés pour le dosage d'activités enzymatiques ont été fournis par Sigma-Aldrich (France).

8.2.1. Dosage de la phénoloxydase

L'activité PO a été déterminée selon le protocole optimisé de Le Bris et al. (2013). Brièvement, 50 µL de tampon Tris-HCl (0,10 M, pH 8,0) ont été ajoutés à 50 µL de fraction acellulaire de l'hémolymphe ou de surnageant protéique, ce mélange a ensuite été incubé à 25 °C pendant 10 min. Suite à cela, 100 µL de substrat, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), à la concentration de 0,04 M ont été ajoutés dans chaque puits. L'activité PO a été déterminée par le suivi de l'absorbance à $\lambda = 492$ nm pendant 30 min. L'auto-oxydation du substrat a également été mesurée et les valeurs obtenues ont été soustraites à celles des échantillons testés. L'activité spécifique de la PO est exprimée en unités arbitraires (U) par mg de protéines totales et a été calculée selon la formule suivante :

$$PO (U/mg) = (\Delta A / \text{min} * fd) / [protéines]$$

Avec ΔA , le différentiel d'absorbance par min ; fd , le facteur de dilution de l'échantillon et $[protéines]$, la concentration en protéines de l'échantillon.

8.2.2. Dosage de la superoxyde dismutase

Le dosage d'activité superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) a été effectué à l'aide du kit SOD Assay Kit (Sigma-Aldrich, France) selon les instructions du fabricant. Cet essai est basé sur le suivi de l'inhibition du complexe xanthine-xanthine oxydase (XO) par l'activité SOD (Figure 30). Un standard de SOD provenant d'érythrocytes bovins (Sigma-Aldrich, France) a été utilisé afin de constituer une gamme étalon variant de 0,01 à 10 U/mL. L'unité de l'activité U est définie comme étant la concentration en SOD entraînant une inhibition de 50 % de la formation du complexe xanthine/XO. L'activité spécifique de la SOD est donc

cette valeur d'activité rapportée à la quantité de protéines totales de l'échantillon et est exprimée en U/mg.

Quelques modifications ont été apportées au protocole fourni avec le kit afin de mesurer la SOD totale (t-SOD), ainsi que les isoenzymes Cu/Zn-SOD (cytosolique et extracellulaire) et Mn-SOD (mitochondriale) (Richard, 2012). Le dosage de la Mn-SOD est effectué en ajoutant 5 mM de cyanure de potassium (KCN) au milieu réactionnel. Enfin, les tests préliminaires ont permis de choisir préférentiellement le tampon « BLOT » pour l'extraction de protéines avant dosage des SOD.

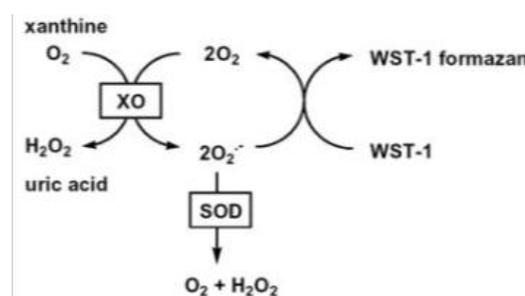


Figure 30 : Principe du dosage de la SOD (SOD Assay Kit, Sigma-Aldrich, France).

8.2.3. Dosage de la catalase

L'activité catalase (CAT) a été mesurée selon la méthode décrite par Aebi (1984). Cet essai consiste à suivre par spectrophotométrie la disparition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Brièvement, 8 µL de surnageant protéique sont ajoutés à 792 µL de milieu réactionnel (PBS 10 mM, H₂O₂ 10 mM, pH 7,4) dans une cuve en quartz de 1 cm de longueur. Immédiatement, le suivi cinétique de 1,5 min est effectué pour chaque échantillon à λ = 240 nm.

L'activité CAT est calculée selon l'expression suivante :

$$CAT (U/mg) = \frac{\Delta A * fd}{\epsilon_{H_2O_2} * l * [protéines]}$$

Avec ΔA , le différentiel d'absorbance par min ; fd , le facteur de dilution de l'échantillon ; $\epsilon_{H_2O_2}$, le coefficient d'extinction molaire de H₂O₂ égal à 39,4 L/mmol/cm ; l , la longueur de la cuve (égale à 1 cm) et $[protéines]$, la concentration en protéines de l'échantillon.

L'activité spécifique CAT est exprimée en U/mg ; 1 U étant définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour dégrader 1 μmole de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$.

Par ailleurs, les tests préliminaires pour l'adaptation de ce protocole chez *R. philippinarum* ont conduit au choix du tampon « PBS » pour la lyse protéique préalable à la mesure de l'activité CAT.

8.2.4. Dosage de la glutathion peroxydase

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx, EC 1.11.1.9) a été dosée selon McFarland et al. (1999). Le principe de ce dosage repose sur le suivi de la diminution de la concentration en NADPH à 340 nm. La GPx totale (t-GPx) et la GPx Selenium-dépendante (Se-GPx) ont été dosées grâce à l'utilisation de substrats spécifiques à ces deux types d'enzymes (Lawrence and Burk, 1976).

Le milieu réactionnel était composé de tampon phosphate salin (PBS, 62,5 mM), acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA ; 6,25 mM), glutathion réduit (GSH ; 2,5 mM), glutathion réductase (GR ; 2,5 U/mL) et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH ; 0,5 mM). Pour l'activité t-GPx, ce milieu contenait en plus l'hydroperoxyde de cumène (CHP ; 1,875 mM) alors que pour l'activité Se-GPx, il contenait en plus de l'azoture de sodium (NaN_3 ; 1,25 mM) et H_2O_2 (0,3125 mM).

La réaction est initiée immédiatement après ajout de 200 μL de milieu réactionnel aux 50 μL de surnageants protéiques. Puis la diminution de la concentration en NADPH est suivie pendant 3 min à $\lambda = 340$ nm. Des « blancs » ont été effectués en remplaçant le surnageant protéique par le tampon d'extraction utilisé préalablement. Les activités enzymatiques GPx ont ensuite été calculées selon la formule suivante :

$$GPx (U/mg) = \frac{\Delta A * fd}{\epsilon_{NADPH} * lc * [protéines]}$$

Avec ΔA_i , le différentiel d'absorbance par min ; fd , le facteur de dilution de l'échantillon ; ϵ_{NADPH} , le coefficient d'extinction molaire de NADPH égal à 6,22 L/mmol/cm ; lc , le facteur de correction pour le trajet optique du à l'utilisation de microplaques (calculé lors de la lecture par le logiciel d'acquisition des données) et $[protéines]$, la concentration en protéines de l'échantillon.

L'activité spécifique (t- et Se-) GPx est exprimée en U/mg ; 1 U étant définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour dégrader 1 μ mole de NADPH/min.

Les tests préliminaires effectués pour l'adaptation de ce protocole ont conduit au choix du tampon « PBS » pour la lyse protéique préalable. En effet, les cinétiques obtenues pour les échantillons lysés avec le tampon « BLOT » n'ont pas permis de détecter d'activité GPx ou alors une activité bien plus faible que celle obtenue avec le tampon « PBS » (Figure 31).

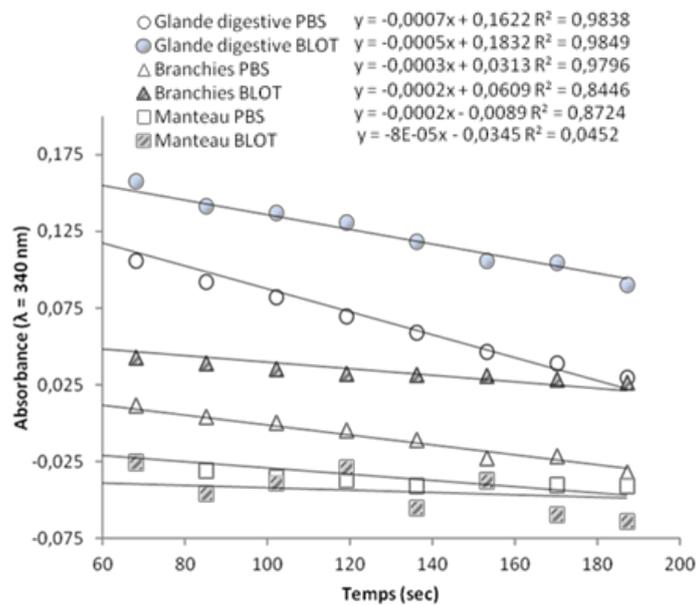


Figure 31 : Exemple de suivi de l'absorbance ($\lambda = 340$ nm) en fonction du temps dans les surnageants de glandes digestives, branchies et manteaux de *R. philippinarum* lysés dans le tampon « BLOT » ou « PBS » dans le cadre du dosage de la t-GPx (l'absorbance des « blancs tampons » a été soustraite en chaque point pour plus de lisibilité sur ce graphique étant donné que le tampon « BLOT » possède une absorbance propre qui est plus élevée que celle du tampon « PBS »).

8.2.5. Dosage de la glutathion réductase

L'activité glutathion réductase (GR, EC 1.8.1.7) a été déterminée suivant le protocole de Cribb et al. (1989). Succinctement, 20 μ L de surnageant protéique ont été mélangés avec 170 μ L de milieu réactionnel (PBS, 100 mM ; NADPH, 0,7 mM ; acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) ou DTNB, 0,09 mM ; glutathion oxydé ou GSSG, 0,2 mM). Immédiatement, la cinétique de l'activité GR est suivie pendant 3 min à $\lambda = 412$ nm. Le « blanc » réactionnel consistait en l'ajout de 20 μ L du tampon de lyse préalablement utilisé pour les organes à la

place du surnageant protéique, son absorbance a été soustraite à celle des échantillons. Les activités GR ont ensuite été calculées suivant la formule suivante :

$$GR (U/mg) = \frac{\Delta A * fd}{\epsilon_{DTNB} * lc * [protéines]}$$

Avec ΔA_i , le différentiel d'absorbance par min ; fd , le facteur de dilution de l'échantillon ; ϵ_{DTNB} , le coefficient d'extinction molaire du DTNB égal à 14,15 L/mmol/cm ; lc , le facteur de correction pour le trajet optique du à l'utilisation de microplaques (calculé lors de la lecture par le logiciel d'acquisition des données) et $[protéines]$, la concentration en protéines de l'échantillon.

L'activité spécifique GR est exprimée en U/mg ; 1 U étant définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour dégrader 1 μ mole de DTNB/min.

Les tests préliminaires d'adaptation de ce dosage n'ont pas permis d'observer de différences d'activité GR entre les échantillons préalablement lysés dans le tampon « PBS » ou le tampon « BLOT ».

8.2.6. Dosage de la glutathion S transférase

L'activité glutathion-S-transférase (GST, EC 2.5.1.18) a été mesurée selon McFarland et al. (1999). Brièvement, la réaction est initiée par l'ajout de 200 μ L de milieu réactionnel (PBS, 200 mM ; 2,4-dinitrochlorobenzène ou CDNB, 1 mM ; GSH, 1 mM) aux 15 μ L de surnageant protéique dans chaque puits. La cinétique de la réaction est alors suivie pendant 3 min à $\lambda = 340$ nm. Le « blanc » réactionnel consistait en l'ajout de 15 μ L du tampon de lyse préalablement utilisé pour les organes à la place du surnageant protéique, son absorbance a été soustraite à celle des échantillons. L'activité GST a ensuite été calculée suivant la formule suivante :

$$GST (U/mg) = \frac{\Delta A * fd}{\epsilon_{CDNB} * lc * [protéines]}$$

Avec ΔA_i , le différentiel d'absorbance par min ; fd , le facteur de dilution de l'échantillon ; ϵ_{CDNB} , le coefficient d'extinction molaire du CDNB égal à 9,6 L/mmol/cm ; lc , le facteur de correction pour le trajet optique du à l'utilisation de microplaques (calculé lors

de la lecture par le logiciel d'acquisition des données) et [protéines], la concentration en protéines de l'échantillon.

L'activité spécifique GST est exprimée en U/mg ; 1 U étant définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour dégrader 1 μ mole de CDNB/min.

Enfin, une lyse des échantillons dans le tampon « PBS » est préférable avant la mesure d'activité GST. En effet, les cinétiques obtenues pour les échantillons lysés avec le tampon « BLOT » ne permettent de détecter qu'une très faible activité GST dans les organes par rapport à ceux qui ont été lysés dans le tampon « PBS » (Figure 32).

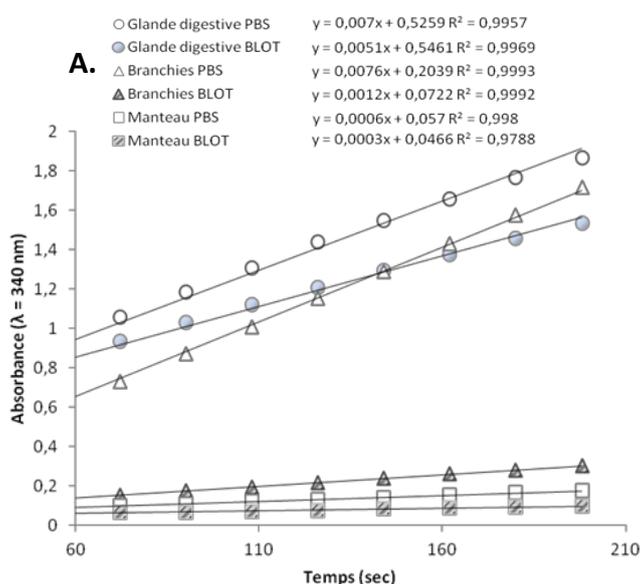


Figure 32 : Exemple de suivi de l'absorbance ($\lambda = 340$ nm) en fonction du temps dans les surnageants de glandes digestives, branchies et manteaux de *R. philippinarum* lysés dans le tampon « BLOT » ou « PBS » (absorbance des blancs soustraites) dans le cadre du dosage de la GST.

8.2.7. Dosage de la thioredoxine réductase

L'activité thioredoxine réductase (TrxR, EC 1.8.1.9) a été dosée selon la méthode décrite par Smith & Levander (2002). La réaction est initiée par l'ajout de 200 μ L de milieu réactionnel (PBS, 62,5 mM ; EDTA, 12,5 mM ; NADPH, 0,3 mM ; DTNB, 3,125 M) aux 50 μ L de surnageant protéique et, après 1 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est suivie pendant 3 min à $\lambda = 412$ nm. De plus, chaque échantillon a été testé en présence d'aurothioglucose (ATG, 20 μ M), un inhibiteur de la TrxR, afin d'évaluer l'activité qui n'est pas imputable à la TrxR dans l'échantillon. Cette valeur et celle des « blancs » constitués de

50 µL du tampon de lyse préalablement utilisé pour les organes à la place du surnageant protéique (avec et sans incubation avec ATG) ont été soustraites à celle des échantillons. L'activité TrxR a ensuite été calculée suivant la formule suivante :

$$TrxR (U/mg) = \frac{\Delta A * fd}{\varepsilon_{TNB} * lc * [protéines]}$$

Avec ΔA_i , le différentiel d'absorbance par min ; fd , le facteur de dilution de l'échantillon ; ε_{TNB} , le coefficient d'extinction molaire du TNB égal à 13,6 L/mmol/cm (étant donné que 2 moles de TNB sont produites pour chaque DTNB consommé, le coefficient effectif est finalement 27,2 L/mmol/cm) ; lc , le facteur de correction pour le trajet optique du à l'utilisation de microplaques (calculé lors de la lecture par le logiciel d'acquisition des données) et $[protéines]$, la concentration en protéines de l'échantillon.

L'activité spécifique TrxR est exprimée en U/mg ; 1 U étant définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour dégrader 1 µmole de TNB/min.

Pour ce dosage, l'un ou l'autre des deux tampons de lyse protéique peut être utilisé sans occasionner de différences dans les activités TrxR des échantillons.

8.2.8. Dosage de l'oxyde nitrique synthase inductible

La méthode la plus sensible visant à doser l'activité de l'oxyde nitrique synthase (NOS, EC 1.14.13.39) est basée sur des méthodes radioactives permettant de suivre la formation de la L-citrulline (L-CIT) et qui sont plutôt consommatrices en terme de temps. D'autres méthodes non radioactives existent, comme notamment celle utilisant le réactif de Griess très couramment utilisée. Cependant, ce protocole dose en fait les concentrations en nitrates et nitrites issus de la dégradation du monoxyde d'azote et ne permet donc pas d'évaluer directement l'activité de la NOS.

Le dosage de la iNOS a fait l'objet d'une adaptation de protocole au cours de cette thèse. La méthode développée est basée sur le dosage de la L-CIT de manière non radioactive comme proposé par Knipp and Vasak (2000). Cette méthode était initialement prévue pour le dosage d'une autre enzyme produisant la L-CIT, la dimethylargininase (DDAH) mais a pu être adaptée pour celui de la NOS. Brièvement, la L-CIT produite par réaction enzymatique réagit d'abord avec une oxime (diacetyl monoxime, DAMO) en milieu acide

puis avec un groupe carbamate (thiosemicarbazide, TSC) menant à la production d'une espèce chromogène à des températures élevées (95 °C).

Brièvement, 55 µL de surnageant sont incubés pendant 30 minutes à 37 °C avec 5 µL de milieu réactionnel contenant : Tris (20 mM, pH 7,4), NADPH (1 mM), L-arginine (L-ARG, 1 mM), 5,6,7,8-tetrahydrobiopterine (BH₄, 10 µM), flavine adénine dinucléotide oxydée (FAD⁺, 5 µM). Ces concentrations sont basées sur celles utilisées par Calderon-Cortes et al. (2006) avec quelques ajustements. Contrairement aux NOS constitutives (eNOS et nNOS), la iNOS est Ca²⁺/calmoduline indépendante ainsi ces réactifs n'ont pas été rajoutés au milieu réactionnel (Cho et al., 1992; Gross, 1996). Afin de doser spécifiquement la NOS, les incubations ont été effectuées en présence et absence d'un inhibiteur spécifique, le L-N-monométhyl arginine (L-NMMA, 200 µM) (Knowles and Moncada, 1994). Une gamme étalon a également été produite à l'aide de la iNOS purifiée chez la souris (Sigma-Aldrich) avec des concentrations variant de 0 à 25 U/mL.

Suite à l'incubation, les réactions enzymatiques sont stoppées par l'ajout de 200 µL du réactif permettant le développement de la réaction colorimétrique, COLDER, constitué de : DAMO (20 mM), TSC (0,5 mM), acide phosphorique (H₃PO₄ ; 2,25 M), acide sulfurique (H₂SO₄ ; 4,5 M), sulfate d'ammonium ferrique (NH₄Fe(SO₄)₂·12 H₂O ; 1,5 mM). La microplaque est alors scellée avec un film en aluminium puis placée dans un four à 95 °C sur une plaque d'aluminium et recouverte par une plaque de verre également préalablement préchauffées à 95 °C (Figure 33A). Différentes durées d'incubation au four ont été testées afin de déterminer la durée optimale pour le développement de la coloration (Figure 33B) : les équations obtenues pour la gamme iNOS sont stables pour des durées d'incubation allant de 12 à 18 min. Ainsi, une durée de 15 min d'incubation à 95 °C a été sélectionnée pour cette méthode. La plaque est alors retirée du four pour refroidir durant 10 min à température ambiante et les absorbances sont alors lues à λ = 530 nm.

Les activités sont calculées pour chaque échantillon à l'aide de la gamme étalon après soustraction des valeurs d'absorbance obtenues en présence d'inhibiteur et celles des « blancs » constitués de 50 µL du tampon de lyse préalablement utilisé pour les organes. L'activité spécifique iNOS est exprimée en U/mg ; 1 U étant définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour produire 1 µmole de L-CIT/min.

L'influence du tampon de lyse utilisé sur différents organes de *R. philippinarum* a également été testée dans le cadre de la mise au point de ce protocole. Ainsi, le tampon « PBS » a été sélectionné puisqu'il permet d'obtenir généralement des activités iNOS plus importantes (sauf dans le cas des branchies dont l'activité iNOS ne semble pas être impactée par le tampon utilisé pour la lyse protéique) (Figure 33C).

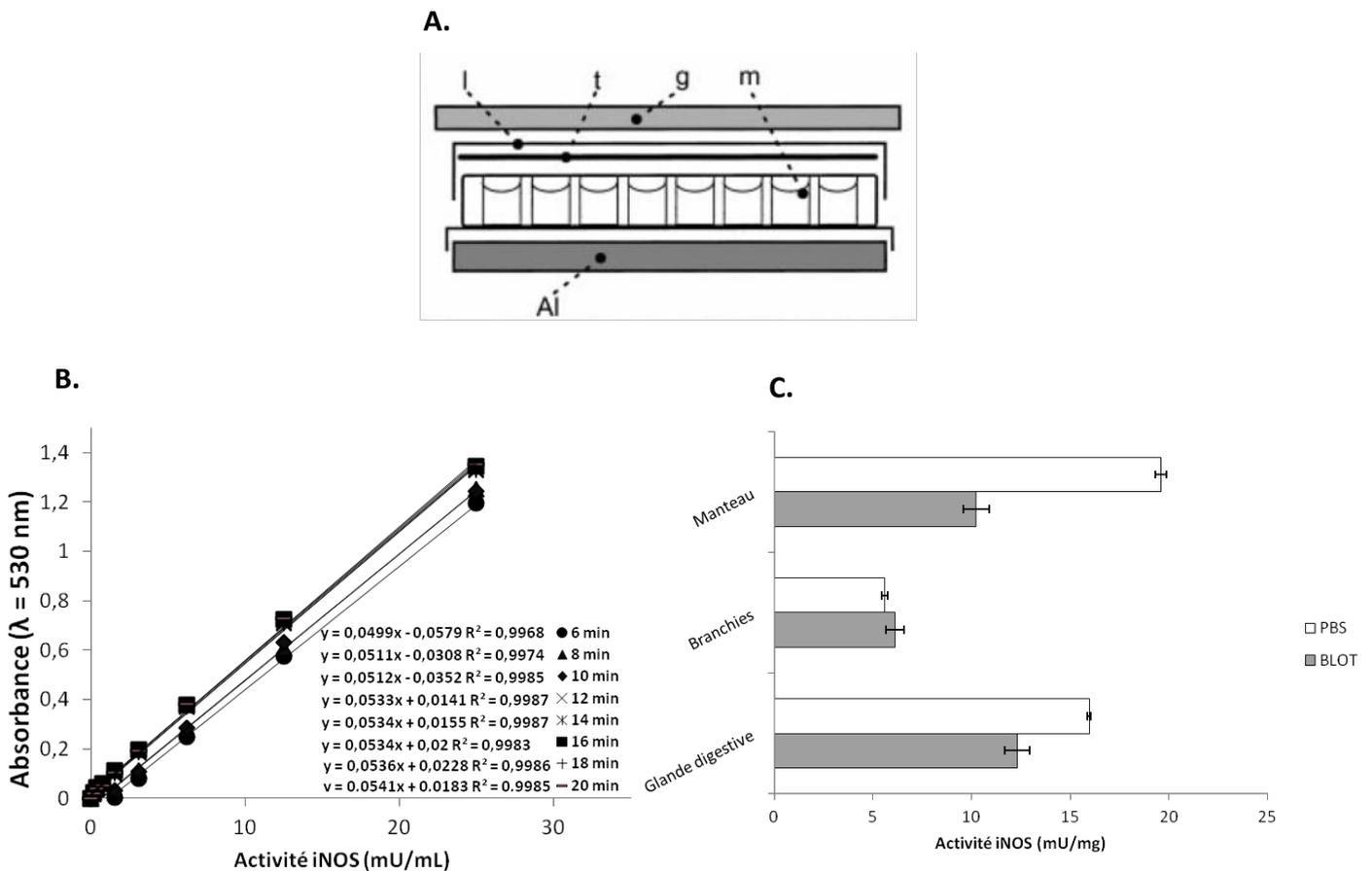


Figure 33 : A. Montage pour le développement de la coloration – d'après Knipp & Vasak, 2000. B. Absorbance en fonction de l'activité iNOS purifiée chez la souris et de la durée d'incubation à 95 °C. C. Activités iNOS dosées dans le manteau, les branchies et la glande digestive de *R. philippinarum* en fonction du tampon de lyse protéique utilisé (« PBS » ou « BLOT »).

Abréviations: m = microplaque; l = couvercle de la microplaque; t = film en aluminium thermorésistant; Al = plaque en aluminium préchauffée à 95 °C; g = plaque en verre préchauffée à 95 °C.

8.2.9. Dosage de la pyruvate kinase

L'activité pyruvate kinase (PK, EC 2.7.1.40) a été évaluée selon la méthode de Greenway and Storey (1999). 20 μL de surnageant protéique sont versés dans chaque puits et la réaction est démarrée par l'ajout de 180 μL de mélange réactionnel : Imidazole (100 mM), nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH, 2 mM), Roténone saturée en éthanol (0,2 % v/v), lactate deshydrogénase (LDH, 1 U/mL). La réaction est suivie par spectrophotométrie pendant 15 min à $\lambda = 340 \text{ nm}$. Le « blanc » réactionnel consistait en l'ajout de 20 μL du tampon de lyse préalablement utilisé pour les organes à la place du surnageant protéique, son absorbance a été soustraite à celle des échantillons. Les activités spécifiques sont exprimées en U/mg ; 1 U étant définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1 μmole de NADH/min ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ L/mmole/cm}$).

8.2.10. Dosage de l'hexokinase

L'activité hexokinase (HK, EC 2.7.1.1) a été dosée selon le protocole décrit par Greenway and Storey (1999). Brièvement, 20 μL de surnageant protéique ont été mélangés à 200 μL de tampon réactionnel : Tris (100 mM), EDTA (1 mM), chlorure de magnésium (MgCl_2 , 2 mM), glucose (5 mM), adénosine triphosphate (ATP, 1 mM), nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (NADP^+ , 0,2 mM), glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PDH, 1 U/mL). La cinétique de la réaction est suivie pendant 15 min à $\lambda = 340 \text{ nm}$. Le « blanc » réactionnel consistait en l'ajout de 20 μL du tampon de lyse préalablement utilisé pour les organes à la place du surnageant protéique, son absorbance a été soustraite à celle des échantillons. Les activités spécifiques sont exprimées en U/mg ; 1 U étant définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour réduire 1 μmole de NADP^+ /min ($\epsilon_{\text{NADP}^+} = 6,22 \text{ L/mmole/cm}$).

8.2.11. Dosage de la citrate synthase

L'activité citrate synthase (CS, EC 2.3.3.8) a été dosée en suivant le protocole de (Childress and Somero, 1979). Brièvement, 20 μL de surnageant protéique ainsi que des dilutions sériées de CS (variant de 5 à 100 mU/mL) purifiée à partir de cœur de porc (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés dans les puits. Puis, 100 μL de mélange réactionnel : acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA, 0,25 mM), DTNB (0,125 mM), Tris-HCl (100 mM).

La réaction est déclenchée par l'ajout de 20 μL d'une solution d'oxaloacétate (5 mM) et est suivie pendant 10 min à $\lambda = 412 \text{ nm}$. Le « blanc » réactionnel consistait en l'ajout de 20 μL du tampon de lyse préalablement utilisé pour les organes à la place du surnageant protéique, son absorbance a été soustraite à celle des échantillons. Les activités spécifiques sont exprimées en U/mg ; 1 U étant définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser 1 μmole de TNB/min ($\epsilon_{\text{TNB}} = 13,6 \text{ L/mmole/cm}$).

8.3. Lipides

8.3.1. Classes de lipides

Sept classes de lipides neutres ont été analysées dans les échantillons de glande digestive dans le cadre de l'expérimentation 2 selon le protocole décrit précédemment par (Haberkorn et al., 2010). Les lipides neutres ont été extraits à partir de 40 mg de poudre dans une solution de Folch (chloroforme : méthanol, 2 : 1) et conservés au $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Les classes de lipides ont été analysées par chromatographie sur couche mince haute-performance (CCM-HP) sur des plaques de verre (10 x 10 mm) recouverte d'un gel de silice (Merck, France). Un passage préliminaire de la plaque dans une solution d'hexane : diéthyl éther (1 : 1) a été effectué afin d'éliminer les impuretés puis la plaque a été activée pendant 30 min par chauffage à $110 \text{ }^\circ\text{C}$. Les échantillons ont ensuite été déposés sur les plaques grâce à un automate (CAMAG, Suisse) et les lipides neutres ont été séparés dans des cuves contenant un mélange d'hexane : diéthyl éther : acide acétique (20 : 5 : 0,5). Enfin, une étape de révélation dans une solution d'acide phosphorique contenant du sulfate de cuivre a permis de faire apparaître les spots noirs correspondant aux différentes classes de lipides après chauffage pendant 20 min à $160 \text{ }^\circ\text{C}$.

Les 7 classes de lipides (acides gras libres, esters de stérols, éthers de glycérol, monoacylglycérol, diacylglycérol, triacylglycérols et stérols) ont été identifiées à l'aide de standards (Sigma-Aldrich, France). Les plaques sont ensuite lues à $\lambda = 370 \text{ nm}$ et les spots sont quantifiés grâce au logiciel Wincats (Camag, Suisse). Les résultats ont ensuite été exprimés en mg/g de poids frais pour chaque classe de lipide identifiée.

8.3.2. Analyses des acides gras

8.3.2.1. Préparation des échantillons

Dans le cadre de l'expérimentation 2, l'analyse des acides gras a été menée sur des échantillons de culture d'algue et sur quelques pools de manteau et de glandes digestives.

Algues

Des échantillons de culture d'algue *C. calcitrans* (n = 2) et T-Iso (n = 3) ont été filtrés sur des filtres GF/F préalablement brûlés et placés dans des tubes de 6 mL contenant une solution de Folch puis conservés à -20 °C.

Palourdes

Les pools de glandes digestives des individus témoins nourris avec *C. calcitrans* (n=4) et T-Iso (n=5) à 2 jpi (cf Tableau 5) ont été choisis pour l'analyse : 24 animaux nourris avec *C. calcitrans* et 19 animaux nourris avec T-Iso ont été sélectionnés pour l'analyse des AG neutres. Tous les pools de manteaux échantillonnés à 7 jpi (cf Tableau 5) ont été choisis pour l'analyse des AG polaires.

L'extraction des lipides à partir de ces pools a été effectuée en plaçant les poudres pré-pesées dans des tubes de 6 mL contenant une solution de Folch ; ceux-ci ont été conservés à -20 °C jusqu'aux analyses.

8.3.2.2. Séparation des lipides neutres et polaires et analyse des acides gras

Un aliquot des solutions contenant les lipides extraits précédemment est évaporé à sec sous azote. Ceux-ci sont ensuite récupérés après 3 lavages dans une solution de chloroforme : méthanol (98 : 2). La séparation des lipides neutres et polaires a été effectuée à l'aide de micro-colonne de silice comme décrit par Marty et al., (1992). Une première élution avec une solution de chloroforme : méthanol (98 : 2) permet de récupérer les lipides neutres. La deuxième élution quant à elle, est effectuée avec du méthanol pur afin de collecter les lipides polaires. Puis, des quantités connues d'acides gras 23 :0 ont été ajoutées à chaque échantillon (dans les fractions neutres et polaires) comme des standards internes.

Enfin, les lipides neutres et polaires ont été transestérifiés à l'aide d'une solution de trifluorure de bore à 10 % dans le méthanol (Metcalfé and Schmitz, 1961). Les acides gras

ont ensuite été analysés dans un chromatographe en phase gazeuse (CPG) muni d'un injecteur automatique on-colonne et d'un détecteur FID (Flame Ionization Detector). Ils sont enfin identifiés par comparaison des temps de rétention obtenus avec les standards.

8.4. Glucides

Les glucides ont été extraits en même temps que les protéines dans le tampon « PBS » puis dosés selon la méthode colorimétrique de Dubois et al. (1956). Une solution standard de glucose à 0,4 mg/mL a été diluée en série dans le tampon « PBS » afin d'obtenir une gamme standard de concentrations variant de 0,01 à 0,4 mg/mL. La première étape du dosage consistait à ajouter 500 µL d'une solution de phénol (5 %) dans des tubes à essai en verre contenant 250 µL d'échantillon ou bien de solution standard de glucose. Cette solution a ensuite été incubée pendant 40 min à l'obscurité et la réaction colorimétrique a été initiée par l'ajout de 2,5 mL d'acide sulfurique (H₂SO₄) pur. Après 40 min d'incubation, les solutions ont été placées dans des cuvettes et les absorbances sont lues à 490 et 600 nm. Les concentrations en glucides ont été calculées en utilisant la courbe standard et selon l'équation suivante :

$$DO = DO_{490} - 1,5 * (DO_{600} - 0,003)$$

Avec DO_{490} , la densité optique à $\lambda = 490$ nm ; DO_{600} , la densité optique à $\lambda = 600$ nm.

Les résultats ont ensuite été exprimés en mg/g de poids frais.

9. Quantification de *V. tapetis* dans les fluides extrapalléaux

La validation de la méthode de quantification de *V. tapetis* dans les fluides extrapalléaux des palourdes mise au point par Adeline Bidault (AI UBO, LEMAR) a fait l'objet de prélèvements supplémentaires lors de l'expérimentation 2. Cette technique repose sur la quantification de l'ADN bactérien par réaction en chaîne par polymérase quantitative ou qPCR (Bidault et al., soumis, Annexe 2). Brièvement, l'ADN total a été extrait des échantillons de fluides extrapalléaux à l'aide du kit QIAgen QIAamp DNA mini kit (QIAgen®) en suivant les instructions du fournisseur.

La quantification par qPCR a été effectuée pour chaque échantillon en triplicata à l'aide du kit LightCycler 480® Probe Master Mix (Roche Diagnostics, Allemagne). Chaque

réaction a été réalisée dans un volume final de 15 μL contenant : 5 μL d'extrait d'ADN de l'échantillon, 2,5 μL contenant les amorces et la sonde (amorce sens à 0,5 μM , amorce anti-sens à 0,5 μM , sonde virB4-P1 à 0,1 μM) et 7,5 μL du réactif LC480 Master Mix 2X. La qPCR a été effectuée sur un thermocycleur LightCycler 480[®] (Roche Diagnostics, Allemagne) selon le programme suivant: dénaturation initiale à 95 °C pendant 10 min, 45 cycles (dénaturation 10 sec à 95 °C, hybridation des amorces 20 sec à 54 °C, élongation 1 sec à 72 °C) et une élongation finale de 10 sec à 40 °C.

Les résultats ont été analysés avec le logiciel fourni avec le thermocycleur et une quantification absolue a été réalisée à l'aide d'une courbe étalon obtenue après des dilutions sériées d'ADN purifié de *V. tapetis* CECT 4600^T. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules de *V. tapetis* par mL de fluides extrapalléaux.

10. Analyses statistiques

10.1. Analyse de coordonnées principales de matrices de voisinage et partition de la variance

L'objet de l'expérimentation préliminaire était de savoir si les activités PO, SOD et CAT de *R. philippinarum* étaient soumises à des variations endogène cycliques.

Une analyse des coordonnées principales de matrices de voisinage (« Principal Coordinates of Neighbour Matrices » ou PCNM) a été choisie pour répondre à cette problématique. Cette technique d'analyse, utilisée en écologie des populations, a été mise au point par Borcard & Legendre (2002) et permet de détecter et de quantifier les variations spatio-temporelles à différentes échelles. Les données temporelles issues de notre jeu de données expérimentales (30 temps associés aux prélèvements) sont représentées dans une matrice des distances euclidiennes. Une analyse en coordonnées principales est réalisée sur cette matrice afin d'en extraire les vecteurs propres. Seuls les vecteurs propres associés à des valeurs propres positives sont sélectionnés pour la suite de l'analyse car ils possèdent un sens biologique interprétable¹³. Une régression multiple est alors produite à partir de ces vecteurs propres sur les variables mesurées (PO, SOD, CAT) afin de modéliser la corrélation

¹³ Un vecteur propre associé à une valeur propre positive témoigne d'une auto-corrélation positive, i.e., deux valeurs d'une variable consécutives dans le temps seront proches.

temporelle présente dans le jeu de données à différentes échelles. Enfin, une analyse de la partition de la variation multivariée du jeu de données est effectuée en fonction des variables explicatives (Figure 34A). Pour cela, la significativité du modèle suivant est évaluée par une analyse de la variance (ANOVA) : $Y = f(X, E)$

Avec Y, la matrice des variables réponses (activités SOD, CAT, PO dans les branchies et l'hémolymphes) ; X, la matrice des vecteurs propres associés aux valeurs propres positives issues de l'analyse PCNM et E, la matrice des variables environnementales (température, salinité, concentration en O₂ dissous).

La partition de la variance de ce modèle est représentée à l'aide d'un diagramme de Venn (Figure 34B). Les scripts R développés par Olivier Gauthier (MC UBO, LEMAR) et Pierre Legendre (Pr Université de Montréal) ont été utilisés pour mener l'analyse PCNM avec notre jeu de données sur le logiciel R version 3.1.2 (R Core Team, 2011).

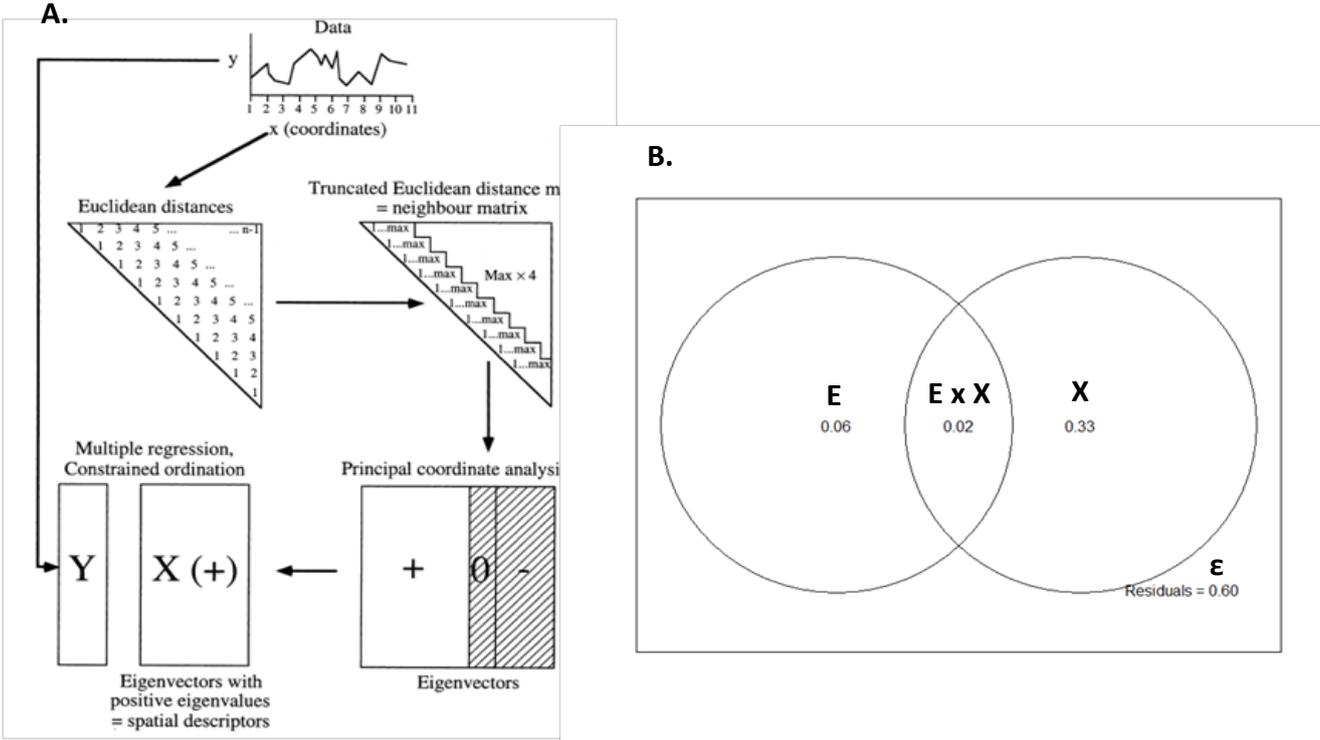


Figure 34 : A. Schéma explicatif de la méthode PCNM (d'après Borcard et Legendre, 2002). B. Diagramme de Venn représentant la partition de la variance du modèle où E, E x X, X et ε sont les parts de la variance du modèle expliquées respectivement par l'environnement, l'interaction environnement x temps et les résidus (part expliquée ni par l'environnement, ni par le temps ou leur interaction).

10.2. Analyses de la variance : plan d'expérience en parcelles divisées

Pour l'expérimentation 1, des analyses de la variance associées à un plan d'expérience en parcelles divisées (Split split plot ANOVA) ont été effectuées pour chaque variable (concentration en protéines, activités SOD et PO). Cette méthode est largement utilisée en agronomie afin d'évaluer l'influence de la répartition (physique) de chaque répétition de combinaison de conditions (bloc aléatoire). Ce cas de figure est adapté à notre cas puisque cette expérimentation a été planifiée de telle façon que les différentes combinaisons de conditions (température x condition d'injection x temps de prélèvement) ou blocs ont été disposées aléatoirement dans la salle d'expérimentation.

Lorsque des différences significatives étaient observées, un test post-hoc Tukey adapté à ce type de plan d'expérience a été effectué pour déterminer les moyennes significativement différentes. Les postulats de normalité et d'homoscédasticité des résidus du modèle ont été vérifiés graphiquement. Lorsque cela a été nécessaire, les variables explicatives ont été (log x +1)-transformées afin de satisfaire ces postulats.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 3.1.2 (R Core Team, 2011), en utilisant les packages « Stats » (R Core Team, 2011) et « TukeyC » (Faria, 2014).

10.3. Analyse de variance multivariée par permutations

Dans le cadre de l'étude par pool associée à l'expérimentation 2, le problème principal était de savoir si l'ensemble des paramètres biochimiques mesurés était impacté par les conditions d'injection (FSW et *V. tapetis*), l'occurrence de la MAB (MAB+ et MAB-) et le régime algal (*T-Iso* et *C. calcitrans*). Etant donnée le caractère non équilibré de notre jeu de données, nous avons créé une variable explicative, nommée « traitement » prenant en compte la condition d'injection, l'occurrence de la MAB et le temps de prélèvement. Cette variable contient finalement sept conditions : témoin à 2 jpi, MAB- à 2 jpi, témoin à 7 jpi, MAB- à 7 jpi, MAB+ à 7 jpi, témoin à 30 jpi et MAB+ à 30 jpi (cf Tableau 5).

Des analyses de la variance multivariée permutationnelles (PERMANOVA) ont été menées sur ce jeu de données. La PERMANOVA est une analyse non-paramétrique permettant d'évaluer la part de la variance d'un jeu de données attribuée à chaque variable explicative (Anderson, 2001). Cette méthode est adaptée aux échantillons de petite taille ainsi qu'aux dispositifs expérimentaux non-équilibrés, comme c'est le cas pour notre jeu de données. Cette analyse produit un pseudo rapport-F (pseudo-statistique de Fischer) qui est défini comme étant le rapport de dissimilarité intra- et inter-traitement. Sa significativité est testée par 999 permutations.

Cependant, ce type d'analyse ne permet pas d'observer les corrélations entre les variables. Nous avons décidé d'effectuer en plus une analyse en composantes principales (ACP) afin de visualiser la répartition des pools et les corrélations entre les variables en fonction des conditions testées.

Enfin, des tests de comparaison *a posteriori* ont été effectués pour chaque variable (ANOVA) afin d'avoir une idée plus précise des variables les plus impactées par les conditions testées.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 3.1.2 (R Core Team, 2011). Les PERMANOVA ont été effectuées à l'aide de la fonction « adonis » et l'homogénéité des dispersions multivariées a été testée à l'aide de la fonction « betadisper » du package « vegan » (Oksanen et al., 2015). La fonction « rda » du package « vegan » a été utilisée pour les ACPs et les graphes (biplots) ont été conçus à l'aide du package « ggplot2 » (Wickham and Chang, 2015).

10.4. Modélisation Linéaire Mixte

Un des objectifs de l'étude individuelle associée à l'expérimentation 2 était d'évaluer l'impact des conditions testées (algue, injection, temps) et de facteurs internes (sexe, maturité, occurrence MAB) sur l'intensité de la MAB, les paramètres immunitaires et la charge bactérienne dans les fluides extrapalléaux. La méthode d'analyse statistique utilisée pour chacune des variables expliquées est la modélisation linéaire à effet mixte (« Linear Mixed-effects Model » ou LMM).

La première étape de cette analyse consiste à spécifier le modèle testé. Dans notre cas, les effets fixes du modèle étaient les variables explicatives régime algal, condition d'injection et temps post-injection ainsi que les covariables occurrence de la MAB, sexe et maturité sexuelle chez les individus. L'effet aléatoire du modèle est dû à la présence d'un facteur « bloc » correspondant à la date de prélèvement pour chaque temps post-injection (2, 7 et 30)¹⁴.

La modélisation est évaluée à l'aide de la méthode d'estimation du maximum de vraisemblance en comparant le modèle saturé (comprenant toutes les conditions testées) avec les modèles incomplets. Pour cela, des tests du rapport de vraisemblance (LR tests) sont effectués afin de déterminer les variables de prédiction « apportant significativement de l'information » au modèle.

Enfin, lorsque les variables expliquées étaient significativement impactées par les conditions testées, le test LS-means (« least-square means » initialement développé sur SAS) a été utilisé comme post-hoc.

Les postulats concernant la distribution normale des résidus du modèle et leur homoscedasticité ont été vérifiés graphiquement à l'aide de normogrammes et de représentations graphiques de la répartition des résidus en fonction des valeurs prédites.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 3.1.2 (R Core Team, 2011), en utilisant la fonction « lmer » du package « lme4 » (Bates et al., 2013).

10.5. Modélisation Linéaire Généralisée Mixte : régression logistique

Un des objectifs de l'étude individuelle menée pour l'expérimentation 2 était d'évaluer l'influence des conditions d'injection, de nourriture, de temps post-injection ainsi que du sexe et de la maturité sexuelle de l'animal sur l'occurrence de la MAB chez les individus. Une approche par la modélisation linéaire généralisée a donc été utilisée du fait de la nature binaire de la réponse que l'on cherche à expliquer.

¹⁴ Chaque temps de prélèvement a été dédoublé pour des raisons d'organisation au moment de l'expérimentation.

Avec cette méthode, on cherche à modéliser la probabilité qu'un individu soit malade en considérant les comptes d'animaux MAB+ et MAB-. Dans notre cas, les effets fixes du modèle étaient les variables explicatives régime algal, condition d'injection et temps post-injection ainsi que les covariables occurrence de la MAB, sexe et maturité sexuelle chez les individus. L'effet aléatoire du modèle est dû à la présence d'un facteur « bloc » correspondant au jour de prélèvement¹⁵.

Etant donné que la variable expliquée est de type binaire, c'est en fait une régression logistique utilisant la loi de probabilité binomiale qui a été effectuée. Brièvement, la probabilité pour chaque individu λ d'être malade peut s'écrire de la façon suivante :

$$P(MAB_{(\lambda)} = 1 / P_i) = \text{logit}^{-1}(\hat{\alpha} + \sum_i \hat{\beta}_i P_i + \hat{\gamma}R + \varepsilon)$$

Avec $P(MAB_{(\lambda)} = 1 / P_i)$, la probabilité que l'individu λ soit malade de la MAB; logit^{-1} est la fonction inverse de la fonction de lien logit utilisée pour la modélisation; $\hat{\alpha}$ correspond au coefficient associé à l'ordonnée à l'origine de la régression; $\hat{\beta}_i$ sont les coefficients associés aux effets fixes de la régression et $\hat{\gamma}$ aux effets aléatoires de celle-ci; P_i sont les variables de prédiction (temps, condition d'injection, régime algal, interaction de ces variables); R est le terme associé à la partie aléatoire du modèle; ε est le terme associé aux résidus de la régression.

Etant donné que $P(MAB_{(\lambda)} = 1 / P_i)$ représente la proportion d'animaux malades parmi la population expérimentale de palourdes, ces probabilités prédites correspondent en fait à la prévalence de la MAB. Ce sont ces valeurs qui sont utilisées pour les représentations graphiques et l'interprétation des résultats par la suite.

Enfin, la modélisation est évaluée à l'aide de la méthode d'estimation du maximum de vraisemblance en comparant le modèle saturé avec les modèles incomplets. Pour cela, des tests du rapport de vraisemblance (LR tests) sont effectués pour déterminer quelles sont les variables de prédiction apportant significativement de « l'information » au modèle. Lorsque les variables expliquées étaient significativement impactées par les conditions

¹⁵ Chaque temps de prélèvement a été dédoublé pour des raisons d'organisation au moment de l'expérimentation, induisant un effet aléatoire.

testées, le test LS-means (« least-square means » initialement développé sur SAS) a été utilisé comme post-hoc.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 3.1.2 (R Core Team, 2011), en utilisant la fonction « glmer » du package « lme4 » (Bates et al., 2013).

10.6. Modélisation linéaire généralisée: régression logistique multinomiale

Pour chaque variable liée au développement de la MAB, CDS et SRS (expérimentation 1), et pour l'interaction sexe-maturité sexuelle (expérimentation 2), qui sont des variables catégorielles à plus de deux niveaux, une régression logistique multinomiale a été effectuée pour tester l'effet des variables explicatives (température, régime algal, exposition à *V. tapetis*).

En prenant l'exemple des données issues de l'expérimentation 1, on cherche à modéliser la probabilité qu'un individu appartienne à une classe d'intensité de la maladie (CDS). Le modèle spécifié utilise les comptes d'animaux obtenus pour chaque niveau de la variable expliquée et les variables explicatives fixes sont la condition d'injection (EMSF, CECT^T, LP2) et la condition de température (15 et 22 °C).

La probabilité pour un individu λ de présenter un stade CDS = k peut s'écrire de la façon suivante :

$$P(CDS_{(\lambda)} = k / P_{(\lambda)}) = \text{logit}^{-1}(\hat{\alpha} + \sum_i \hat{\beta}_i P_i + \varepsilon)$$

Avec $P(CDS_{(\lambda)} = k / P_{(\lambda)})$, la probabilité conditionnelle pour l'individu λ de présenter un stade CDS égal à k sachant les variables de prédiction égales à $P_{(\lambda)}$; logit^{-1} est la fonction inverse de la fonction de lien logit utilisée pour la régression ; $\hat{\alpha}$ est le coefficient associé à l'ordonnée à l'origine de la régression; $\hat{\beta}_i$ sont les coefficients associés aux effets fixes de la régression; P_i sont les variables de prédiction du modèle (condition d'injection, température et interaction de ces variables); ε correspond au terme d'erreur associé à la régression.

Le modèle logistique polynomial associé à chaque variable peut s'écrire donc de la façon suivante :

$$L = \prod_{\lambda} [P(CDS_{(\lambda)} = k / P_{(\lambda)})]^{k_{(\lambda)}} \quad \text{avec } k_{(\lambda)} = 1 \text{ si et seulement si } CDS_{(\lambda)} = k$$

Ce modèle est évalué à l'aide de la méthode d'estimation du maximum de vraisemblance en comparant le modèle saturé avec les modèles incomplets. Des tests du rapport de vraisemblance (LR χ^2 test) ont été utilisés pour déterminer les différences significatives dues aux conditions testées (température et injection).

Lorsque les variables expliquées étaient significativement impactées par les conditions testées, le test LS-means (« least-square means » initialement développé sur SAS) a été utilisé comme post-hoc.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 3.1.2 (R Core Team, 2011), en utilisant la fonction « multinom » du package « nnet » (Venables and Ripley, 2013).

1^{ère} partie

**Effet de la température sur le
développement de la maladie de
l'anneau brun : étude de la réponse
immunitaire de *Ruditapes
philippinarum* exposée à deux
souches de *Vibrio tapetis***

1. Expérimentation préliminaire: existe-t-il un rythme endogène des activités antioxydantes et PO chez *R. philippinarum*

1.1. Introduction et problématique de l'étude

En milieu naturel, les bivalves sont soumis à différentes variations de l'environnement notamment en termes de température, d'oxygénation, de concentration de la ressource trophique et du milieu. Ces modifications de l'environnement peuvent être expliquées par la présence de cycles dont les principaux sont le cycle solaire d'alternance jour/nuit (ou cycle circadien) et le cycle des marées (ou cycle tidal) (Naylor, 2010; Mat, 2012). Ces cycles sont alors appelés « zeitgeber » (« donneur de temps » en allemand) puisqu'ils donnent à l'animal un repère temporel sur lequel son rythme endogène se synchronise. En l'absence de ces indicateurs temporels, le rythme endogène de l'animal fonctionne en « roue libre » (Naylor, 2010).

Chez l'huitre creuse *Crassostrea gigas*, l'existence d'un cycle circadien endogène a été démontrée suite à une étude du comportement des animaux (par valvométrie) en milieu contrôlé (Mat et al., 2012). Par ailleurs, ces auteurs ont également suggéré que ce cycle pouvait être modulé en fonction de la saison puisque l'activité valvaire des animaux est nocturne en périodes automnales et hivernales alors qu'elle est diurne en périodes printanières et estivales (Mat et al., 2012).

Il a été montré que la consommation d'oxygène chez la palourde japonaise suivait un rythme circatidal endogène associé à une période de 12,5 h (Kim et al., 1999). Dans cette étude, les animaux ont subi une période d'entraînement pendant 9 semaines avec des conditions de lumière fixées à 12h de lumière par jour et 12h sans lumière, en conditions contrôlées de température, de salinité et d'alimentation. Suite à cette période, les animaux sont placés dans des chambres respirométriques dans la pénombre totale durant la période de suivi, afin d'observer un cycle endogène (sans « zeitgeber »). Les résultats de cette étude ont d'abord montré que lors de la première semaine, les cycles de respiration étaient relativement irréguliers et correspondaient plutôt à des rythmes circadiens, traduisant ainsi l'effet de l'entraînement pendant les 9 semaines précédentes. Puis à l'issue de ces 7 jours, la

respiration des palourdes a été associée à un rythme circatidal correspondant aux variations de la marée mesurées sur le site de provenance des animaux. C'est ce dernier résultat qui a permis de caractériser ce cycle comme endogène puisque les rythmes des palourdes étaient en condition de « free running », *i.e.* sans la présence d'un zeitgeber (comme le cycle jour/nuit imposé lors des 9 premières semaines de cette expérimentation).

Si l'on considère qu'un tel cycle endogène existe chez les palourdes lors de nos expérimentations en milieu contrôlé, alors cela pourrait avoir un impact sur les variables mesurées lors de suivis d'infection au cours du temps. Par ailleurs, les activités PO et SOD nécessitent la présence d'oxygène pour leur fonctionnement, ainsi si un rythme endogène de la consommation en oxygène est avéré, des répercussions pourraient avoir lieu sur ces activités. **L'objectif de cette expérimentation préliminaire était donc de savoir s'il existait un rythme endogène des activités enzymatiques antioxydantes et phénoloxydase car, si tel était le cas, cela impacterait les temps de prélèvement lors d'une expérimentation impliquant des mesures répétées dans le temps.** Pour ce faire, nous avons acclimaté une centaine de palourdes en conditions « free running », sans apport de nourriture, sans lumière, en mesurant les valeurs de salinité, de température et de concentration en oxygène dissous du milieu durant l'expérimentation. Cette acclimatation a duré une semaine puisque nous voulions éviter la période d'arythmicité détectée par Kim et al. (1999) ayant lieu durant la première semaine en condition « free running ». Suite à cela, 3 à 4 palourdes ont été prélevées toutes les 3 heures pendant 3 jours afin d'obtenir un nombre de prélèvements suffisants pour détecter l'existence d'un éventuel cycle (qu'il soit circadien ou circatidal). Les activités PO, SOD et catalase (CAT) ont été mesurées pour chaque animal prélevé dans l'hémolymphe et dans les branchies.

1.2. Résultats et discussion

Activités SOD et PO dans l'hémolymphe et activités SOD, CAT et PO dans les branchies

Etant donné que la CAT est une enzyme qui a été caractérisée uniquement dans les peroxysomes des cellules des bivalves, son activité n'a pas été recherchée dans le plasma de l'hémolymphe mais uniquement dans les branchies des palourdes. Une première observation des données obtenues pour les activités PO et SOD mesurées dans l'hémolymphe a montré que ces activités étaient particulièrement variables au cours du

temps et entre individus prélevés à un même temps (Figure 35). Par ailleurs, aucune tendance particulière ne semble alors être détectée au cours du temps. Concernant l'évolution des activités SOD, CAT et PO dans les branchies au cours du temps, le même constat peut être fait, c'est-à-dire une variabilité importante au cours du temps, ainsi qu'une variabilité interindividuelle importante même si elle semble plus faible que dans l'hémolymphe.

Existe-t-il un rythme associé à ces activités ?

Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé une méthode d'analyse de séries temporelles permettant *in fine* de partitionner la variance du jeu de données (SOD, CAT et PO dans l'hémolymphe et les branchies) en fonction des données temporelles et des données environnementales (température, salinité, concentration en oxygène dissous du milieu). Le résultat obtenu est présenté dans un diagramme de Venn en Figure 36. La part de la variance associée à l'environnement était très faible (6 %). En effet, de légères variations de la température, de la salinité et de la concentration en oxygène dissous ont été enregistrées mais n'ont pas eu de répercussions sur les activités mesurées. Les variations liées aux données temporelles ont, quant à elles, eu une influence beaucoup plus importante sur ces valeurs d'activités enzymatiques (33 %). Les variations des activités enzymatiques n'étant ni liées aux données temporelles, ni liées aux données environnementales représentent 59 %. En d'autres termes, cela signifie qu'une grande part des variations de ces activités peut être expliquée par un « bruit de fond » ou encore des variabilités interindividuelles, ce qui confirme les premières observations faites quant à l'évolution des activités enzymatiques au cours du temps. Etant donné que les variations temporelles ont été corrélées aux variations des activités enzymatiques, nous avons donc recherché ensuite les périodes des cycles correspondant à ces variations. Deux valeurs de périodes ont été déterminées, une première période a été estimée à 54 h et une seconde à 38 h. Ces périodes, qui ne correspondent à aucun rythme biologique connu, nous ont amené à conclure qu'aucun rythme endogène ne pouvait être associé aux variations des activités SOD, CAT et PO dans les conditions d'expérimentation que nous avons fixées. Il faut néanmoins ne pas oublier qu'au contraire des études menées par Kim et al. (1999) et Mat et al. (2012), les paramètres étudiés ont été mesurés sur des animaux différents pour chaque temps de prélèvement. En effet, l'analyse des activités enzymatiques nécessite de sacrifier

les animaux, ce qui représente un biais important dans cette étude puisque la synchronisation des animaux entre eux n'est pas forcément observable (comm. pers. Audrey Mat). Malgré tout, on peut penser que si un rythme circadien ou circatidal endogène était associé aux activités enzymatiques, nous aurions tout de même pu observer des tendances un peu plus marquées. En effet, de telles variations journalières endogènes des activités antioxydantes hémolymphatiques ont déjà été observées chez deux espèces d'écrevisses, *Procambarus clarkii* et *P. digueti*, alors que les animaux étaient en condition de « free running » sacrifiés à chaque temps de prélèvement (Fanjul-Moles et al., 2003). Dans notre cas, la variabilité interindividuelle des activités semble avoir masqué l'effet des facteurs environnementaux et temporels. **Enfin, si cette expérimentation préliminaire ne permet pas de conclure sur l'existence d'un rythme endogène des activités enzymatiques chez *R. philippinarum*, elle permet en revanche de fixer les conditions expérimentales afin de ne pas biaiser les prochaines expérimentations par l'intervention d'un rythme particulier.** Ainsi, afin de réduire la variabilité interindividuelle, les expérimentations suivantes ont utilisé un plus grand nombre de palourdes prélevées pour chaque temps de prélèvement et plusieurs bacs au sein d'une même condition fixée. Cette variabilité a également été réduite par l'utilisation de pools d'animaux dans le cas de l'expérimentation 2. **Ces mesures permettront donc d'interpréter les variations des activités enzymatiques comme une réponse face aux conditions fixées et non comme des variations endogènes.**

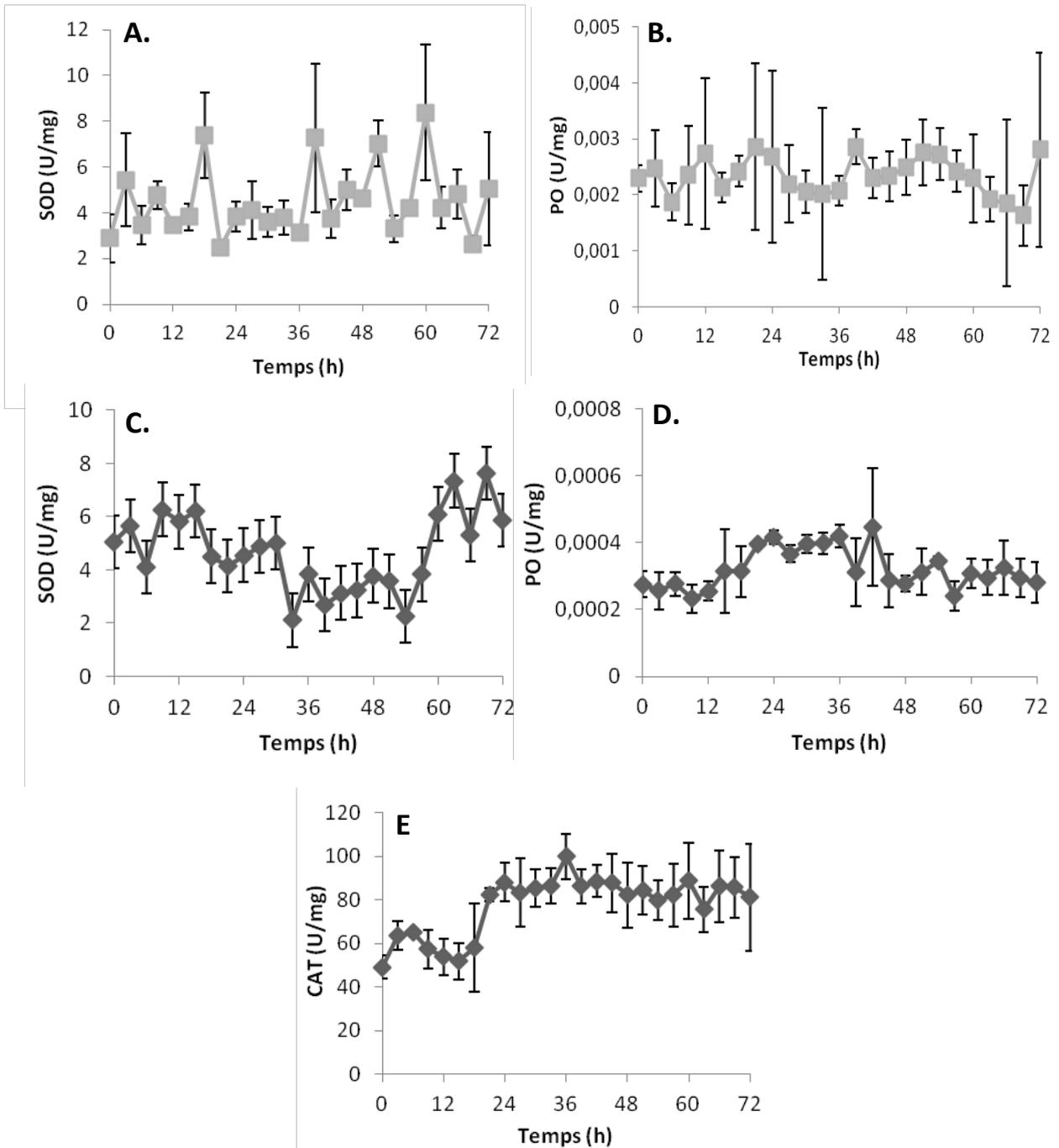


Figure 35 : Valeurs moyennes (n=3, \pm écart-type) de l'activité SOD et PO dans le plasma de l'hémolymphe de *Ruditapes philippinarum* (respectivement A et B) et de l'activité de la SOD, PO et CAT dans les branchies de *Ruditapes philippinarum* (respectivement C, D et E) en fonction du temps (en heures).

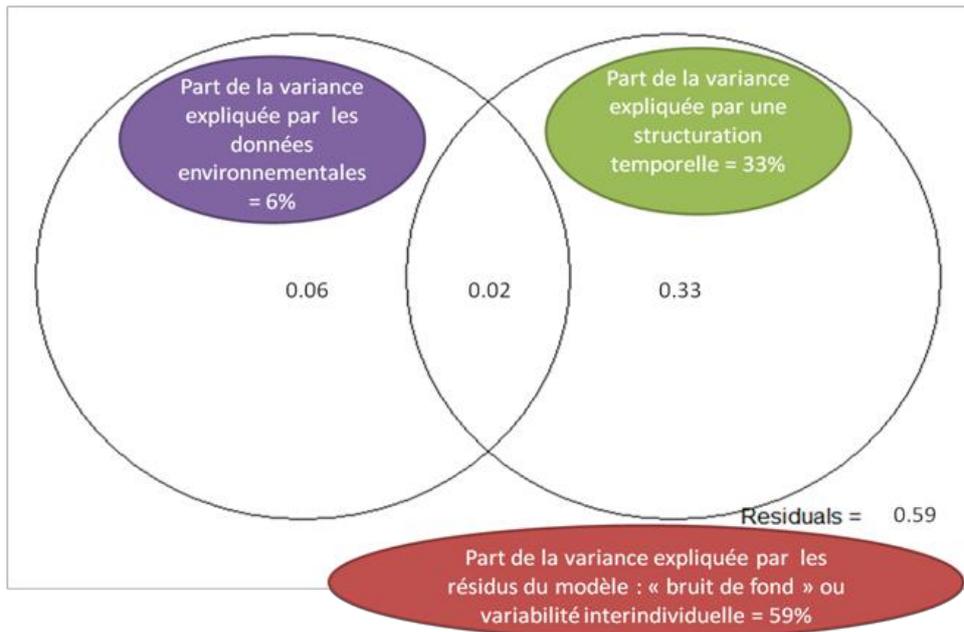


Figure 36 : Diagramme de Venn associé à l'analyse de partition de la variance du modèle $Y=f(X,E)$, avec Y, la matrice des variables SOD, CAT et PO ; X, la matrice des vecteurs propres associés aux valeurs propres positives issues de l'analyse PCNM et E, la matrice des variables environnementales.

2. Effet de la température sur le développement de la maladie de l'anneau brun : étude de la réponse immunitaire de *Ruditapes philippinarum* exposée à deux souches de *V. tapetis*

2.1. Introduction

Le déclenchement d'une maladie infectieuse dans un organisme est la conséquence d'un déséquilibre entre les défenses mises en place par l'hôte, la virulence de l'agent pathogène et ce, dans un environnement plus ou moins favorable (Snieszko, 1974). Dans de nombreux cas de maladies affectant les mollusques, la température du milieu semble être un facteur influençant à la fois les capacités immunitaires de l'hôte et la virulence de l'agent pathogène (Chu and Lapeyre, 1993; Casas et al., 2002; Burreson and Ford, 2004; Paillard et al., 2004a; Dahl et al., 2011; Perrigault et al., 2011). Si l'augmentation de la prévalence et de l'intensité des maladies chez les bivalves est généralement associée aux périodes estivales, ce n'est toutef

ois pas le cas de la maladie de l'anneau brun (MAB), causée par la bactérie Gram-*Vibrio tapetis* (Paillard and Maes, 1990). Même si les premiers épisodes de mortalité associés à la MAB se sont déroulés pendant les périodes estivales de la fin des années 1980 (Paillard, 1992), cela n'a plus été observé par la suite, puisque la maladie se développe majoritairement en périodes hivernales et pré-printanières (Paillard et al., 1997). Ainsi, la MAB est considérée comme une « maladie d'eau froide » associée à une température optimale se situant autour de 14 °C pour son développement (Paillard et al., 1997, 2004a).

Par ailleurs, il a été montré suite à des infections standardisées de différentes souches de *V. tapetis* dans la cavité palléale quela souche isolée lors des premières mortalités observées à Landéda (Finistère, France), la souche CECT4600^T, soit une des plus virulentes chez *R. philippinarum* et que la souche LP2, isolée chez le poisson *Symphodus melops* soit la moins virulente (Choquet et al., 2003; Choquet, 2004; Paillard, 2004b).

Partant de ces constats, le premier objectif de l'expérimentation n°1 était de caractériser le développement de la MAB suite à un challenge thermique et en utilisant deux souches de *V. tapetis* a priori contrastées en termes de virulence. Pour ce faire, nous avons donc choisi la souche CECT4600^T isolée chez *R. philippinarum* (Paillard and Maes, 1995a; Borrego et al., 1996a) de la souche LP2 isolée chez le poisson *Symphodus melops* (Jensen et al., 2003).

De plus, le système enzymatique des phénoloxydases (PO) est considéré comme un élément majeur dans la réponse immunitaire innée chez les invertébrés puisqu'il permet la formation de quinones ayant des propriétés bactéricides, fongicides et antivirales (Cerenius et al., 2008). Chez l'huitre creuse *Saccostrea glomerata*, la PO est notamment associée à la résistance au pathogène QX en permettant l'encapsulation de ce pathogène (Butt & Raftos, 2008). Dans le cadre de la MAB, une matrice de conchioline est formée sur la surface interne de la coquille afin d'enrober *V. tapetis*, cette matrice contiendrait notamment des pigments de type mélanine (Paillard et al., 1994). Il a donc été suggéré que la PO jouerait un rôle important lors du développement de la MAB. Cette hypothèse a été vérifiée lors dans le cadre d'une expérimentation *in vivo* qui a montré que l'activité PO était augmentée chez les

palourdes à 36 heures post-injection avec *V. tapetis* (en cavité extrapalléale périphérique) (Le Bris et al., 2015).

Chez les bivalves, la destruction interne des agents pathogènes est liée à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) (Donaghy et al., 2015). Cependant, l'accumulation de ces espèces chimiques au sein des cellules de l'hôte peut occasionner des dommages au niveau des lipides, des protéines et des acides nucléiques si elles ne sont pas prises en charge par le système antioxydant (Lesser, 2006). Ce système comprend notamment une enzyme clé dans la détoxification des ERO, la superoxyde dismutase (SOD). La SOD transforme la première espèce réactive formée, l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , une ERO moins réactive et plus stable (Sies, 1993; Manduzio et al., 2005). Chez les bivalves, plusieurs études ont cherché à évaluer le rôle de cette enzyme suite à un challenge bactérien et ont généralement montré une augmentation de son activité dans les premiers jours suite à l'infection (Canesi et al., 2010; Genard et al., 2013; Le Bris et al., 2015). Enfin, s'il a été montré que chez la palourde *Chamelea gallina*, l'augmentation de la température de 20 à 30 °C résultait en une diminution de l'activité SOD totale dans les hémocytes et en une augmentation de cette activité dans le plasma (Monari et al., 2007), aucune étude à notre connaissance n'a suivi cette activité dans la cadre d'une infection bactérienne associée à un challenge thermique chez les bivalves.

Ainsi, le second objectif de l'expérimentation n°1 était de caractériser la réponse immunitaire de *R. philippinarum* exposée à deux souches de *V. tapetis* en association avec un challenge thermique. Pour ce faire, nous avons suivi l'activité de la PO et de la SOD dans l'hémolymphe et le manteau des palourdes à 0, 3 et 30 jours post-injection.

2.2. Article 1: Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* – part II: Combined effect of temperature and two *Vibrio tapetis* strains



Full length article

Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* – Part II: Combined effect of temperature and two *V. tapetis* strains



Gaëlle Richard*, Cédric Le Bris, Fabienne Guérard, Christophe Lambert, Christine Paillard

UMR 6539 CNRS UBO IRD IFREMER, LEMAR – IUEM – UBO, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise – Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 August 2014
 Received in revised form
 15 December 2014
 Accepted 18 December 2014
 Available online 3 February 2015

Keywords:

Venerupis philippinarum
Vibrio tapetis
 Temperature
 Phenoloxidase
 Superoxide dismutase

ABSTRACT

Manila clams, *Venerupis philippinarum* (Adams and Reeve, 1850), were experimentally infected with two different bacterial strains and challenged with two different temperatures. Bacterial strains used in this study were *Vibrio tapetis* strain CECT4600^T, the causative agent of Brown Ring Disease (BRD) and *V. tapetis* strain LP2, supposed less virulent to *V. philippinarum*. *V. tapetis* is considered to proliferate at low temperatures, i.e. under 21 °C. In a global warming context we could hypothesize a decrease of mass mortalities caused by *V. tapetis* but these thermal changes could also directly impact the immune system of the host *V. philippinarum*. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of the extrapallial injection with *V. tapetis* combined with temperature challenge on two enzymes activities in *V. philippinarum*. More precisely, after infection, phenoloxidase (PO) and superoxide dismutase (SOD), two major enzymes involved in immune response, were studied for 30 days in two compartments: the mantle and the hemolymph. Conchyolin Deposit Stages (CDS) and Shell Repair Stages (SRS) were also determined 30 days post-injection as a proxy of the virulence of the tested strains. In this study, we highlighted that host–pathogen interaction in a varying environment affects the enzymatic response of the host. The coupled effect of *V. tapetis* injection and temperature challenge was detected 30 days post injection and resulted in virulence differences. These findings were supported by CDS and SRS determination in clams and lead to the conclusion that clam's immunity could be enhanced at 22 °C while *V. tapetis* virulence is lowered at this temperature. Another result of our study was the increase of PO and SOD basal activities as clams are exposed to warmer temperature.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Global change is a real threat to marine invertebrates because increased atmospheric CO₂ is causing ocean warming and acidification [2,3]. In this climate change context, recent studies underlined the fact that mass mortality events and diseases are becoming more frequent in marine ecosystems [4–6]. Filter feeding invertebrates are particularly exposed to these diseases because to capture their food they have to filter great volumes of water, potentially containing microbes and bacteria, through their gills [7]. An example of marine invertebrate susceptibility to bacteria present in their environment, is the case of the Brown Ring Disease

(BRD) affecting the manila clams *Venerupis philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) along European coasts [8]. *V. philippinarum*, native to the Indo-Pacific was introduced in France between 1972 and 1975 for aquaculture purposes because of its faster growth rate compared to the indigenous clam, *Venerupis decussata* (Linnaeus, 1758) [8,9]. Fifteen years after its introduction in France, the first mortality events occurred in the first production site in Landeda (North Finistère, Brittany) [10,11]. These mortalities were associated with a characteristic symptom: an accumulation of a brown organic matrix on the peripheral inner shells [12] giving this disease its name: Brown Ring Disease (BRD). Since 1987, BRD spread along French and European coasts [8] and more recently, the disease symptoms have also been reported in clams in South Korea in 2003 [13] and in Japan in 2008 [14]. BRD is caused by the gram-negative bacterium *Vibrio tapetis* [11,15] which binds to the periostacal lamina of the manila clam and inhibits the normal process

* Corresponding author.

E-mail address: gaelle.richard@univ-brest.fr (G. Richard).

of biomineralization. This inhibition of shell synthesis leads to the formation of a brown organic deposit of conchiolin on the mantle edge and also a degradation of the periostracal lamina [16,17]. More precisely, conchiolin deposits form the first step of diseased animal defense enrobing bacteria [17]. A second step, in infected animals, results in the formation of new calcified layers above the conchiolin deposits. If the clam defense mechanisms are not sufficient, the development of the disease results in the penetration of *V. tapetis* in the extrapallial fluids and then, if tissue lesions occur, penetration into the tissues and into the hemolymph leading to animal death by a general infection [19,20].

This host–pathogen interaction is actually a tripartite interaction because the environmental temperature appears to be a strong influence factor on the progression of BRD as it impacts both on the pathogen and on the host. In fact, *V. tapetis* CECT4600^T (strain isolated in 1990 in France) has an optimal growth temperature of around 20 °C and temperatures greater than 27 °C are lethal for it [21,22]. The optimal temperature for the development of BRD is around 14 °C and between 15 and 21 °C the disease progression is negatively correlated with the temperature [21], which is why BRD is considered as a cold water disease and also why BRD events do not occur in tropical latitudes. The thermal factor also explains the annual cycle of disease observed in clam stocks: the number of diseased organisms increases during winter when water temperature is relatively low [1,23]. The environmental temperature also influences the host immune parameters since in clams maintained at 21 °C, infected with *V. tapetis* CECT4600^T, the dead hemocyte percentage is lower and Leucine AminoPeptidase (LAP) and lysozyme activities are higher than those of animals maintained at 14 or 18 °C [1]. Better shell repair at 21 °C confirms the hypothesis that temperature has a positive influence on the manila clam immune system [1].

Therefore, to better understand the impact of environmental factors, such as temperature, on disease it is not sufficient to study the response of each interaction player in isolation but is necessary to study both at the same time in synergy [24].

More specifically, the aim is to study the impact of water temperature on the immune system of *V. philippinarum* (here evaluated using two key enzyme activities) exposed to two pathogenic strains of *V. tapetis*, previously described as presenting different virulences [36,38]. Pathogenicity is defined as the microbe's capacity to induce disease or provoke damage in the host; this damage can result directly from pathogen's action or from immune response of host [25]. In our study, pathogenicity of *V. tapetis* strains is examined as the damages or symptoms of BRD developed in clams through the apparition of conchiolin deposits on the shell. Virulence involves both bacterium and host and is defined as the degree of pathogenicity or the relative capacity of a microbe to cause damage in the host [25,26]. Thus, virulence can be assessed by microbes' characteristics (such as virulence factors) or by host response analyze [25]. In the present work, the two *V. tapetis* strains' virulence was assessed through host response and more precisely through the degree of disease development in clams (Conchiolin Deposit Stages or CDS) and the degree of shell reparation (Shell Repair Stages or SRS) [8,18]. This virulence assessment is appropriate as *V. tapetis* proliferation in host is proportional to the symptoms' development degree [27].

To evaluate the immune capacity of the host species we decided to monitor two enzyme activities: phenoloxidase (PO) and superoxide dismutase (SOD). PO are copper-binding enzymes converting phenol compounds to unstable quinones. More precisely, phenoloxidases are divided in tyrosinases (E.C.1.14.18.1), which oxidize monophenols into o-diphenols; catecholases (E.C.1.10.3.1), which oxidize o-diphenols into o-quinones; and laccases (E.C. 1.10.3.2), which oxidize o-diphenols into o-quinones and p-diphenols into p-quinones. The produced quinones are then non-enzymatically

polymerized into melanin and its derivatives [28–30]. These compounds are important elements of immune system with their fungistatic, bacteriostatic and antiviral properties [31] and POs are also key enzymes of invertebrate immune systems thanks to their involvement in self/non-self recognition, phagocytosis and nodule formation [32–34]. SOD (E.C. 1.15.1.1) is another oxidoreductase enzyme of immune system preventing reactive oxygen species (ROS) accumulation [35]. Both enzymatic activities have been followed through disease development and recovery in different parts of the animal: the mantle, which is the first tissue in contact with the bacterium after it binds to the periostracal lamina and the hemolymph which is the circulating fluid.

2. Materials and methods

2.1. Biological material and acclimation procedure

For this study, more than 1000 adult clams, *V. philippinarum*, were supplied by SATMAR (Aquaculture Company – Ile Tudy – South Finistère – France). These clams, 39.44 ± 1.96 mm length, were transferred to the laboratory (LEMAR - Institut Universitaire Européen de la Mer, Brest, France), divided into 18 aerated tanks and acclimated for one week before the injections. Nine of these tanks contained 15.3 ± 0.6 °C water and the 9 remaining tanks contained 22.0 ± 1.0 °C. For each tested water temperature, three conditions were applied and tested in triplicate: *V. tapetis* CECT4600^T injections, *V. tapetis* LP2 injections and Sterile Sea Water (SSW) injections (control).

2.2. Bacterial strains

For this study, the following cultured bacterial strains were used:

- *V. tapetis* CECT4600^T (junior synonym: *Vibrio* Prédominant 1: VP1), pathogenic agent of BRD in clams and isolated from diseased *V. philippinarum* in 1990 in Brittany (France; [15,17]). To date this strain is still considered as the most virulent *V. tapetis* strain to *V. philippinarum* [36].
- *V. tapetis* LP2, isolated from *Symphodus melops* in 1999, in Norway [37]. This strain is less virulent to *V. philippinarum* than the CECT4600^T strain after *in vivo* pallial cavity inoculation or after *in vitro* biotests [36,38].

These strains were cultured in Zobell's medium overnight at 18 °C and the bacterial-cell concentrations were determined by spectrophotometry at 490 nm (a correlation between direct counts of colony forming unit and optical density had been established previously).

2.3. Experimental injection

Animals were removed from their tank 12 h before injections and maintained at air temperature close to their respective tank temperature (i.e. 15 or 22 °C). Clams were replaced in sea water (at the water temperature according to their tank), just before injections in order to facilitate their opening. For each thermal condition, one third of the animals were injected with 100 µL of Sterile Sea Water (SSW), a third of animals were injected with 100 µL of *V. tapetis* CECT4600^T suspension (10⁶ CFU mL⁻¹) and the last third of animals received 100 µL of *V. tapetis* LP2 suspension (10⁶ CFU mL⁻¹). Injections were carried out, for the first time, in the peripheral extrapallial fluids localized under the mantle (between the pallial line and the edge of the shell) to allow *V. tapetis* strains to bypass the first biological barrier (mucus and periostracal lamina).

This was performed with a sterile needle (25G 0.5 × 16 mm) fitted onto a 1 mL sterile syringe. The needle was cut to obtain a length of on average 0.2 cm, smaller than the width of the pallial line. After the injections, animals were maintained for six hours out of sea water to force them to remain closed, avoiding rejection of the suspension. Then animals were replaced into their aerated tanks.

2.4. Fluid and tissue collection

For each sampled animal, hemolymph and mantle were collected. For each sampling time, 15 animals (five in each tank) were collected from each treatment. Clams were sampled before the injections (time T0), 72 h and 30 days post-injection (p.i.). For hemolymph, the protein and enzymatic assays were carried out on the serum (acellular fraction).

2.4.1. Hemolymph collection

Clam hemolymph was withdrawn from the posterior muscle using a sterile needle (25G 0.5 × 16 mm) fitted onto a 1 mL sterile syringe, through the shell hinge. Collected hemolymph was then centrifuged at 785 g for 10 min at 4 °C, to separate the cellular fraction from the acellular one. The resulting serum was stored at –80 °C until use.

2.4.2. Tissue collection

After hemolymph collection, the mantle was dissected, frozen in liquid nitrogen and powdered by grinding with liquid nitrogen in a Retsch MM 400 blender. The resulting powder was stored at –80 °C. The powder was resuspended in 500 µL of lysis buffer [39,40] and homogenized using Ultra-Turrax (Modèle PRO 200). Homogenized powder was centrifuged at 10,000 g for 45 min at 4 °C and the supernatant obtained was used for enzymatic and protein assays.

2.5. Protein determination

For all the samples (hemolymph serum and mantle lysate supernatant) the total protein content was determined by the Bradford method [41] using BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad France) and Bovine Serum Albumin (BSA) as the protein standard.

2.6. Enzyme activity assays

2.6.1. Phenoloxidase assays

PO activity was assayed, in 96-well microplates, using a spectrophotometer according to the protocol of Le Bris et al. [42]. Briefly, 50 µL of enzymatic solution (Hemolymph serum and mantle lysate supernatant) and 50 µL of Tris–HCl buffer (0.10 M, pH 8.0) were incubated for 10 min at 25 °C before adding 100 µL 0.04 M L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). L-DOPA, which is commonly used to assay PO activity and is a common substrate to the different PO. Absorbance (A) of reaction mixtures was measured using a microplate spectrophotometer (POLARstar Omega – BMG Labtech). Absorbance was measured for 30 min, at 492 nm and 25 °C. Simultaneously, the spontaneous oxidation of L-DOPA was measured, replacing enzymatic solution with pure water in blank runs, and the values obtained were subtracted from the test values. The PO specific activities were calculated as:

$$\text{PO specific activity (U.l. mg protein}^{-1}) = \frac{(\Delta A \cdot \text{min}^{-1} \times \text{dilution factor})}{\text{Total protein concentration}}$$

where $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ is the value of the increment of absorbance per minute, dilution factor is the sample's factor of dilution, and total

protein concentration is the sample's protein concentration assayed with Bradford's method.

2.6.2. Superoxide dismutase assays

Total superoxide dismutase activity was assayed using a spectrophotometer in 96-well microplates (Greiner 96-F-bottom) by an indirect method based on competition of SOD with Water Soluble Tetrazolium salt (WST-1) for reduction of O_2^- . Briefly, 20 µL of sample solution and 200 µL of WST-1 solution were added to each well and gently mixed. The reaction was initiated by adding 20 µL xanthine oxydase (XO) and xanthine mix (enzyme solution) to each well, thus forming superoxide anions used by SOD and WST-1 (SOD Assay kit, SIGMA ALDRICH). Two blanks were performed, one by replacing sample solution with milliQ-water (background reduction of O_2^-), the other one by replacing sample solution with milliQ-water and enzyme solution with dilution buffer (blank without reaction).

The reduction of WST-1 by O_2^- produces a yellowish formazan dye whose absorbance can be read at 450 nm after 20 min incubation at 25 °C with POLARstar Omega microplate reader (BMG LABTECH). As the WST-1 reduction rate by O_2^- is linearly related to XO activity and is inhibited by SOD, SOD activity is calculated as an inhibition activity of this reaction. Subsequently, a standard inhibition curve was performed using SOD from bovine erythrocytes (SIGMA ALDRICH). SOD activities were expressed in units (U) per mg of protein (U/mg); 1 U of SOD being defined as the amount of enzyme inhibiting the reaction by 50%.

2.7. Classification of BRD syndrome

After tissue and fluids collection, the remaining tissues were removed and BRD diagnostic was carried out on the shell according to the classification developed by Paillard & Maes [18]. The CDS (Conchiolin Deposit Stage), which takes into account the extent, location and thickness of the conchiolin deposit and shell repair stages (SRS), which takes into account the recovery of conchiolin deposit by calcified layers, were determined for each clam. CDS 0 corresponds to healthy clams and SRS 1 corresponds to diseased clams beginning their repair process. As SRS were evaluated only on diseased clams, no SRS 0 were reported. After the final sampling time, more than 100 clams remained for each treatment. These animals were used to carry out the BRD diagnostic.

2.8. Statistical analyses

Three-way split-split-plot analyses of variance (ANOVA) were conducted to determine differences in PO, SOD and protein contents in each tissue according to the water temperature challenge (fixed effect with two levels: 15 °C and 22 °C), the injection condition (fixed effect with three levels: SSW, LP2 and CECT4600^T), time p.i. (fixed effect with three levels: T0, 72 h and 30 days p.i.) and their interaction Injection × Time p.i.. The unit of replication was the tank in which temperature challenged-clams of the same water temperature condition were placed (n = 9 tanks for each water temperature condition). The main plots were water temperature levels (15 °C and 22 °C), subplots were injection levels (SSW, LP2 and CECT4600^T) and sub-subplots were sampling times (time p.i.). The model used for these analyses was the linear model using the 'aov' function of R that fits an ANOVA model. Where significant differences were obtained, a post-hoc analysis was carried out using a Tukey's HSD test to determine which means were significantly different for main effects and interaction effects. Normality of residuals and homoscedasticity were assessed by graphical methods. Explained variables were all transformed using the $\log(x + 1)$

transformation in order to satisfy the normality and homoscedasticity assumptions.

For BRD diagnostic analyses, i.e. CDS and SRS which are categorical data with more than two levels, a multinomial logistic regression was performed using the 'multinom' function of R. The model used for this analysis considered the counts of clams in each class of CDS or SRS as a function of water temperature and injection condition, and their interaction. The significant differences for each condition were calculated using likelihood ratio tests.

All Statistical analyses were carried out using R (version 2.15.3; [43]) using the following packages: TukeyC [44], nnet [45] and car [46].

3. Results

3.1. Protein contents

In the mantle, a significant effect of water temperature ($F = 43.6$, $p = 2.5 \times 10^{-5}$) was observed regardless of time and was associated with an increase in protein contents at 22 °C (Fig. 1A).

In hemolymph, significant interacting effects of time, water temperature and injection ($F = 4.52$, $p = 0.007$) and interacting effects of time and water temperature ($F = 4.79$, $p = 0.018$)

occurred 30 days p.i.: protein contents did not differ whatever the injection at 22 °C while there was an increase in protein contents in LP2- and SSW- challenged clams and, in contrast, a reduction in protein contents in CECT4600^T-challenged clams at 15 °C (Fig. 1B).

3.2. Enzymatic activities

3.2.1. PO activities

Results of statistical analyses are summarized in Tables 1 and 2. In the mantle, significant interacting effects of time and water temperature ($F = 10.74$, $p = 0.00047$) and interacting effects of time and injection ($F = 4.47$, $p = 0.008$) were observed and resulted in an increase of PO basal activity before injection at 22 °C and in a rise of PO activity 30 days p.i. in CECT4600^T-challenged clams at 22 °C (Fig. 2A).

In hemolymph, a significant time and water temperature interaction ($F = 9.3$, $p = 0.001$) led to the rise of PO basal activity in CECT4600^T- and LP2-challenged clams. No water temperature and injection interaction was observed ($F = 2.17$, $p = 0.1569$) but PO activities were at the same level in CECT4600^T- and LP2-challenged clams 30 days p.i. at 22 °C whereas PO activity in CECT4600^T-challenged clams were above LP2-challenged clams and control clams (Fig. 2B).

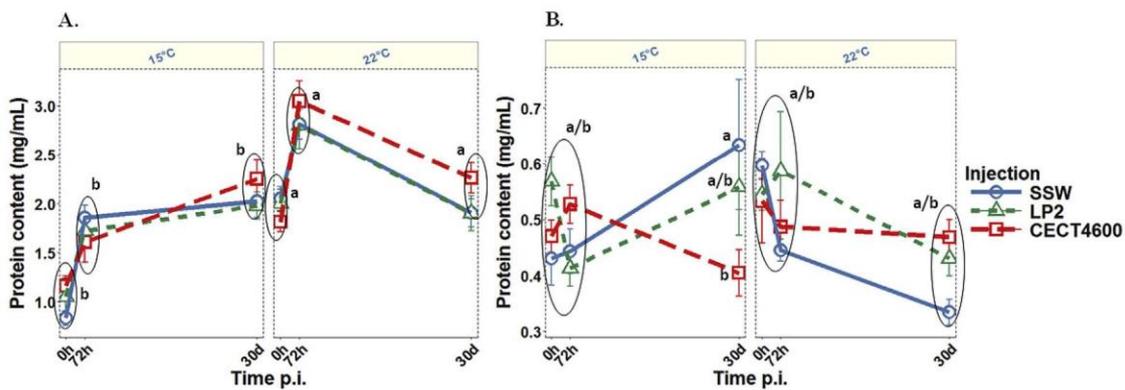


Fig. 1. Mean protein contents in mantle (A) and hemolymph (B) of *V. philippinarum* after temperature challenge (15 °C and 22 °C) and post-injection (p.i.) with *V. tapetis* (strains CECT4600 and LP2) or Sterile Seawater (SSW). Error bars represent standard error. Letters indicate significant differences in protein contents upon injection and time between groups (Split-plot ANOVA followed by post hoc Tukey's HSD test, $\alpha = 0.05$). $N = 15$ individuals for each sampling time and injection combination.

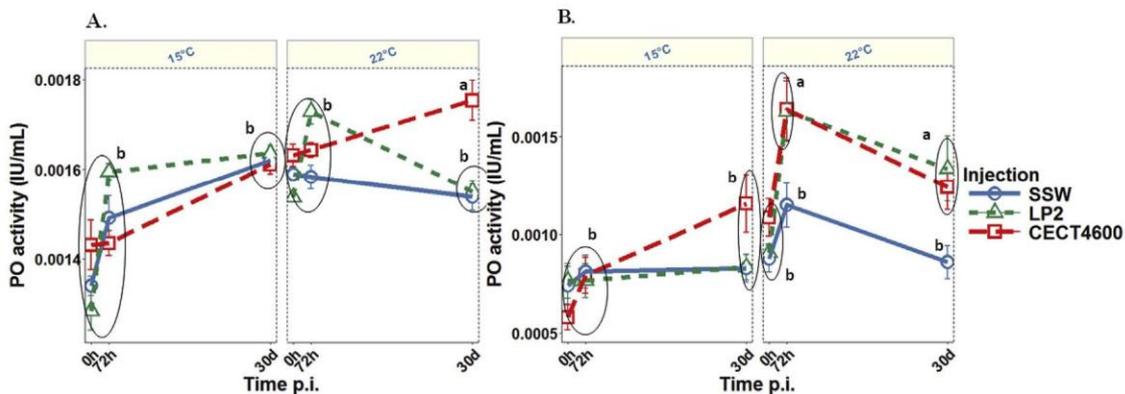


Fig. 2. PO activities in mantle (A) and hemolymph (B) of *V. philippinarum* after temperature challenge (15 °C and 22 °C) and post-injection (p.i.) with *V. tapetis* (strains CECT4600 and LP2) or Sterile Seawater (SSW). Error bars represent standard error. Letters indicate significant differences in protein contents upon injection and time between groups (Split-plot ANOVA followed by post hoc Tukey's HSD test, $\alpha = 0.05$). $N = 15$ individuals for each sampling time and injection combination.

3.2.2. SOD activities

Results of statistical analyses are summarized in Tables 1 and 2. Significant interactions between water temperature and time ($F = 9.64, P = 0.0008$) and between injection and time ($F = 3.459, p = 0.02$) were observed in the mantle. SOD basal activity rose before injection at 22 °C and 30 days p.i., SOD activity in CECT4600^T - and LP2-challenged clams were at the same level at 22 °C whereas at 15 °C, CECT4600^T-challenged clams exhibited higher SOD activities than the other injected clams (Fig. 3A).

In hemolymph, only the interaction between time and injection was significant ($F = 4.33, p = 0.008$) but was the same regardless of water temperature (Fig. 3B).

effect ($\chi = 87.5, p = 1.49 \cdot 10^{-15}$) of the model. Indeed, almost all individuals were symptomatic when CECT4600^T-injected whereas, 25% of LP2-challenged clams and more than 50% of control clams were still asymptomatic 30 days p.i. (Fig. 4). The water temperature effect was also significant ($\chi = 9.8, p = 0.044$) and was associated with the reduction of symptomatic clams at 22 °C regardless of injection. A significant interaction between water temperature and injection ($\chi = 53.9, p = 7.3 \cdot 10^{-9}$) occurred as the reduction of symptomatic clams in CECT4600^T-challenged individuals at 22 °C was more important than in LP2-challenged-ones. SRS were also significantly injection dependent ($\chi = 20.26, p = 0.0004$) as control clams always exhibited higher repair stages than LP2- and

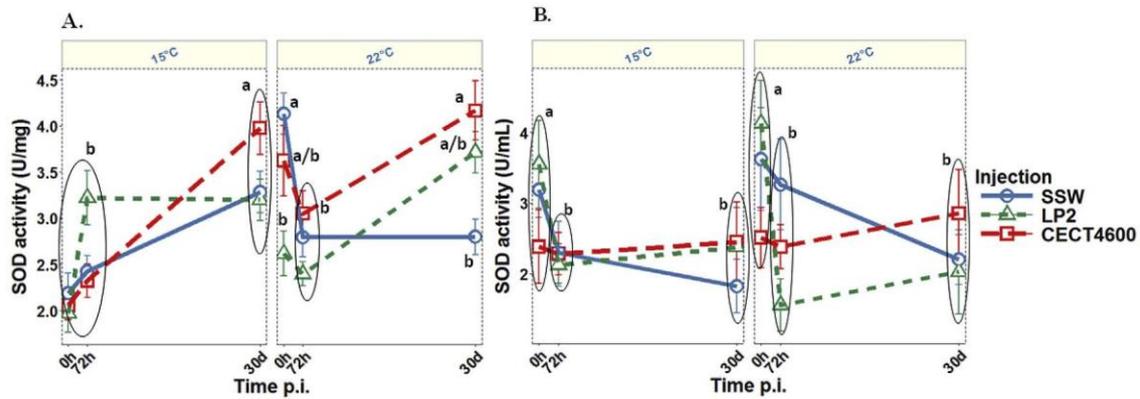


Fig. 3. Mean SOD activities in mantle (A) and hemolymph (B) of *V. philippinarum* after temperature challenge (15 °C and 22 °C) and post-injection (p.i.) with *V. tapetis* (strains CECT4600 and LP2) or Sterile Seawater (SSW). Error bars represent standard error. Letters indicate significant differences in protein contents upon injection and time between groups (Split-plot ANOVA followed by post hoc Tukey HSD test, $\alpha = 0.05$). $N = 15$ individuals for each sampling time and injection combination.

3.3. BRD diagnostic (CDS and SRS)

Results of statistical analyses are summarized in Table 3. CDS are evidently injection-dependent and this was the main significant

CECT4600^T-challenged clams, regardless of water temperature. A significant water temperature effect ($\chi = 39.9, p = 2.16 \cdot 10^{-9}$) resulted in higher SRS in clams incubated at 22 °C seawater, regardless of injection (Fig. 5).

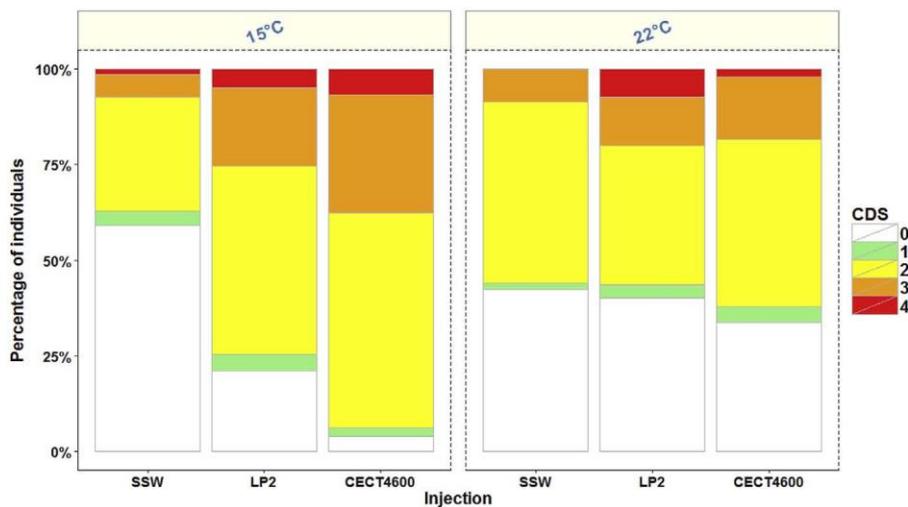


Fig. 4. Concholin Deposit Stages (CDS) in *V. philippinarum* 30 days p.i. with *V. tapetis* (strains CECT4600 and LP2) or Sterile Seawater(SSW) at 15 and 22 °C. CDS were determined for more than 100 individuals per injection group.

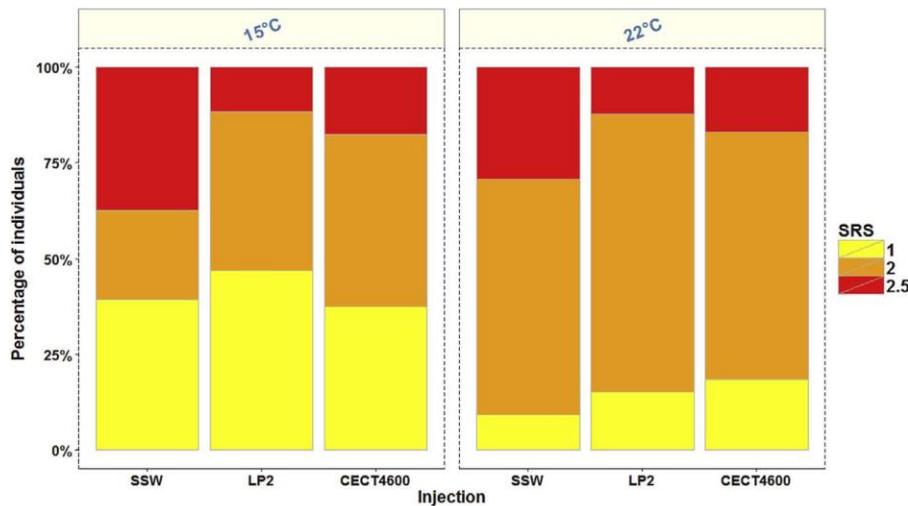


Fig. 5. Shell Repair Stages (SRS) in BRD-symptomatic clams 30 days p.i. with *V. tapetis* (strains CECT4600 and LP2) or Sterile Seawater (SSW) at 15 and 22 °C. SRS were determined for more than 100 individuals per injection group.

Table 1

Summary of the split–split plot three-way ANOVAs on the effect of temperature, injection condition and time p.i. on protein contents, PO and SOD activities in mantle of *V. philippinarum*.

Mantle							
Source of variation	d.f.	Protein contents		PO activity		SOD activity	
		F	p	F	p	F	p
Main plot analysis							
Water temperature	1	43.598	***	35.93	***	26.494	***
Error (Tank)	16						
Subplot analysis							
Injection	2	0.489	N.S.	2.59	N.S.	2.916	N.S.
Water temperature × Injection	2	0.014	N.S.	2.21	N.S.	3.209	N.S.
Error (Tank × Water temperature × Injection)	12						
Sub-subplot analysis							
Time	2	30.763	***	17.224	***	13.657	***
Water temperature × Time	2	18.251	***	10,736	***	9.64	***
Injection × Time	4	0.563	N.S.	4.475	**	3.459	*
Water temperature × Injection × Time	4	1.295	N.S.	1.564	N.S.	2.272	N.S.
Error (Tank × Water temperature × Injection × Time)	24						

Independent variables were water temperature (15 °C and 22 °C), injection condition (SSW, CECT4600^T and LP2) and time p.i. (0 h, 72 h and 30 d). Significant differences are indicated by ***: $p < 0.001$; **: $0.001 < p < 0.01$; *: $0.01 < p < 0.05$; and no significant difference: N.S. (ANOVA, $\alpha = 0.05$).

Table 2

Summary of the split–split plot three-way ANOVAs on the effect of temperature, injection condition and time p.i. on protein contents, PO and SOD activities in hemolymph of *V. philippinarum*.

Hemolymph							
Source of variation	d.f.	Protein contents		PO activity		SOD activity	
		F	p	F	p	F	p
Main plot analysis							
Water temperature	1	0.001	N.S.	27.472	***	0.174	N.S.
Error (Tank)	16						
Subplot analysis							
Injection	2	0.644	N.S.	2.901	N.S.	0.168	N.S.
Water temperature × Injection	2	0.297	N.S.	2.17	N.S.	0.573	N.S.
Error (Tank × Water temperature × Injection)	12						
Sub-subplot analysis							
Time	2	2.407	N.S.	13.481	***	9.303	**
Water temperature × Time	2	4.789	*	9.3	***	0.242	N.S.
Injection × Time	4	0.588	N.S.	1.4	N.S.	4.33	**
Water temperature × Injection × Time	4	4.525	**	2.185	N.S.	1.14	N.S.
Error (Tank × Water temperature × Injection × Time)	24						

Independent variables were water temperature (15 °C and 22 °C), injection condition (SSW, CECT4600^T and LP2) and time p.i. (0 h, 72 h and 30 d). Significant differences are indicated by ***: $p < 0.001$; **: $0.001 < p < 0.01$; *: $0.01 < p < 0.05$; and no significant difference: N.S. (ANOVA, $\alpha = 0.05$).

Table 3

Summary of the multinomial regression on the effect of temperature, injection condition and time p.i. on CDS and SRS in *V. philippinarum*.

Factor	CDS		SRS	
	LR χ^2	p	LR χ^2	p
Water temperature	9.808	*	39.907	***
Injection	87.509	***	20.259	***
Water temperature \times Injection	53.871	***	4.874	N.S.

Independent variables were water temperature (15 °C and 22 °C) and injection condition (SSW, CECT4600^T and LP2). Significant differences are indicated by ***; p < 0.001; **, 0.001 < p < 0.01; *, 0.01 < p < 0.05; and no significant difference: N.S. (ANOVA, α = 0.05).

4. Discussion

4.1. Enzymatic activities

The first result observed was the difference in basal enzymatic activities, before the injections. In fact, at T0 both PO and SOD activities were significantly higher at 22 °C than at 15 °C. In this study PO and SOD activities were used as potential biomarkers of immune system so the higher level of enzymatic activities at 22 °C could be interpreted as better immune abilities for animals acclimated at 22 °C compared to animals acclimated at 15 °C. This result was consistent with the fact that the growth optimal water temperature for *V. philippinarum*, from northern Adriatic lagoons, is between 20 and 24 °C [47]. In other words, between these water temperatures, the manila clam can devote its energy to growth because the naturally high enzymatic activity level allows the clam to quickly and effectively counter a pathogen intrusion without a high-energetic cost and without unbalancing the energy budget [48]. Similar results have also been obtained for cellular immunity of *V. philippinarum* because hemocytes phagocytosis activity and granulocyte number are positively correlated with water temperature [1] reflecting better abilities to fight against pathogens. This result was also consistent with Fisher's [49] findings, who concluded that water temperature can significantly modulate the cellular and humoral activities of marine bivalves. Nevertheless, it must be noted that these higher enzymatic activities were dependent to the optimal growth temperature: for instance when water temperature exceeded 20 °C most of the physiological processes of *Apostichopus japonicus*, including phagocytosis, became slower [50] but the optimal growth and food consumption water temperature is, for this species, between 14 and 15 °C [50]. In the oyster *Crassostrea virginica*, although if total hemocytes counts, phagocytic capability and percentage of granulocytes were higher at high acclimation water temperature; animals were more sensitive to *Perkinsus marinus* at these higher water temperatures [51].

In this study, the effect of injections seemed to be temperature dependent for both enzymatic activities. For PO activity in hemolymph, 3 days after the injections, the enzymatic activity was increased to a greater extent at 22 °C compared to 15 °C for the three kinds of injection. This result confirms the superior abilities of *V. philippinarum* to fight bacterium at 22 °C compared to 15 °C. More precisely, in the hemolymph, the trends observed at 15 °C were similar for LP2 and SSW injections and different to CECT4600^T injection whereas at 22 °C, the trends are similar for both *V. tapetis* strains and different to SSW. Considering that variations of enzymatic activities were proportional to strain virulence, it seemed that at 15 °C CECT4600^T was more virulent than LP2 and it was consistent with results obtained by Choquet et al. [36] who found that CECT4600^T is the most virulent *V. tapetis* strain for the manila clam. At 22 °C PO activity increases were the same after CECT4600^T and LP2 injections meaning that virulence of both strains were similar and it could be explained by the fact that optimal water

temperature of CECT4600^T *V. tapetis* strain is around 20 °C [21,22] but between 15 and 21 °C BRD symptom development is negatively correlated with water temperature [21]. In hemolymph, the fact that PO activities increased for the first three days before decreasing until the end of the experiment could be interpreted as mechanisms acting to fight against pathogen entrance or, when the increase is less important, as for SSW injections, mechanisms to protect after the opening of the extrapallial cavity due to the entrance of the needle. The decrease of PO activity observed from the third day to the end of the experiment was a reflection of the quick and effective immune response at 22 °C whereas, at 15 °C this immune response did not appear so quickly or/and so effectively and continued until the end of the experiment. The increase of PO activity level was also observed in the hemocytes of *V. philippinarum* after infection by *Perkinsus atlanticus* (Pilar et al., 2006). Recently, Liu et al. [52] demonstrated that challenges with two others *Vibrio* species (*Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus*) could induce immune and oxidative stress in *V. philippinarum* hepatopancreas.

In this study the oxidative stress was investigated through the SOD activity. At 15 °C SOD increased for 30 days for the three injection treatments whereas at 22 °C the activity decreased for 3 days and then increased. Nevertheless, results obtained 30 days after the injections confirmed the findings from PO activity in hemolymph. In fact, 30 days p.i., at 15 °C, the SOD activity levels in the mantle were not significantly different for SSW and LP2 injected animals and lower than CECT4600^T injected animals whereas at 22 °C the SOD activity levels were quite similar for both strain injected animals and significantly higher than for SSW injected animals.

Results obtained in this study with enzymatic activities revealed that at 22 °C the immune response was better than at 15 °C. While at 15 °C a difference in virulence could be inferred between the two *V. tapetis* strains in terms of the enzymatic activities, this difference did not appear at 22 °C.

4.2. BRD diagnostic

Two index values could be obtained by assessing the BRD diagnostic according to Paillard & Maes [18]. The first one is the CDS which expresses the development of the disease through the extent of conchiolin deposits. Results obtained 30 days p.i. were the most relevant as visual symptoms are not visible in the first few days following the injections (Paillard, pers com). At the end of the experiment, CDS of symptomatic clams ranged from 1 to 4, which do not cause mortalities (mortalities reached 3.63% at the end of the experiment).

Results obtained with control clams 30 days p.i. showed CDS from 1 to 4, but in a lesser extent than with *V. tapetis* injected clams (more than 50% of control clams were asymptomatic). This proportion of symptomatic control clams is explained by the natural prevalence of BRD in environment. Indeed, at T0, less than 5% of the clams were symptomatic (CDS 2): the disease evolution until 30 days p.i. with SSW injected clams is due to the normal evolution of BRD when clams at T0 are not *V. tapetis*-free in this standardized infection experiment [18]. However, CDS intensity and percentages of symptomatic clams in control condition were always inferior to those in *V. tapetis* injected clams, thus confirming the effect of *Vibrio tapetis*' injections. Comparing results obtained for each strain at both water temperatures could allow us to draw conclusions about differential virulence as a function of water temperature. Thus at 15 °C and after 30 days p.i., CECT4600^T injections led to less than 4% of asymptomatic clams whereas at 22 °C around 35% of clams were still asymptomatic 30 days p.i.. This result confirms the fact that at 22 °C *V. tapetis* CECT4600^T is

less virulent than at 15 °C and is also consistent with the optimal condition of growth for this strain [21,22]. There was also an increase in the asymptomatic clams' number between 15 and 22 °C for *V. tapetis* LP2 strain but to a lesser extent. In fact, at 15 °C around 20% of animals were still asymptomatic whereas at 22 °C around 40% of animals were still asymptomatic. In view of CDS values, it seemed that the increase in water temperature from 15 to 22 °C caused a decrease in virulence of both tested bacteria strains but this decrease appeared to be more important for CECT4600^T as compared to LP2. This difference could be explained by the fact that the CECT4600^T strain has a growth optimal temperature of around 20 °C [21,22] compared to 23 °C for the LP2 strain [37]. It may be surprising that the LP2 strain was not more virulent at 22 °C than at 15 °C as it was closer to its optimal growth temperature. To understand this result we must consider that MAB is an interaction between the host, the pathogen and the environment [48]. Therefore, even if the environment was favorable for the pathogen, its development could be inhibited by the host immune system which appeared to be better at 22 °C than at 15 °C, as suggested by the enzymatic activities.

Clam immune abilities were also investigated through the Shell Repair Stages (SRS) values and this index does not consider the tested strain virulence because it is only estimated on animals exhibiting disease symptoms. For the three tested conditions, the low repair values (i.e. SRS1) were significantly lower at 22 °C than at 15 °C meaning that shell repair is better at 22 °C. This positive correlation between water temperature and repair abilities have already been observed in the natural environment with higher shell repair stages during spring than during winter [18]. Similar results have also been obtained during laboratory experiments with better shell repair in infected clams at 21 °C than at 18 °C and 14 °C [1]. For bacterial injected animals, the percentage of clams that were SRS2.5 were very similar at 15 and 22 °C: 11% and 12% for LP2 and 18% and 17% for CECT4600^T, at 15 and 22 °C respectively. The percentage of SRS2 individuals, for injected animals, was significantly higher at 22 °C compared to 15 °C. This percentage was multiplied by 1.7 for LP2 injected animals whereas it was multiplied by 1.4 for CECT4600^T injected clams. Therefore, the better shell repair at 22 °C is comparable between both strains confirming the fact that at 22 °C the immune system abilities are increased independently of the bacterial strain.

4.3. Conclusions

Results obtained during this experiment led us to the conclusion that thermal factor directly impacts BRD development. As in other host–pathogen interactions, BRD is characterized by an extreme specificity and a sophisticated interplay between host and parasite [24]. The studied factor, i.e. water temperature, impacted the host immune system, the *Vibrio* virulence and so the interaction between both. At 15 °C, *V. tapetis* CECT4600^T seemed to be more virulent than *V. tapetis* LP2 but at 22 °C this difference was not observed. In fact, at 22 °C CECT4600^T virulence greatly decreased, resulting in a virulence similar to that of LP2. Moreover, the enhanced immune abilities of clams led to lower BRD development. Thus, in a global warming context, these results suggest that the manila clam could survive *V. tapetis* infections thanks to better immune abilities (increase of PO and SOD enzymatic activities) but virulence of strains, to date considered as low, could be increased and become a new threat for *V. philippinarum*.

Acknowledgments

This work was supported by the “Laboratoire d'Excellence” LabexMER (ANR-10-LABX-19) and co-funded by a grant from the

French government under the program “Investissements d'Avenir”, and by a grant from the Regional Council of Brittany. This work was also funded by University of Western Brittany. We would first like to thank the SATMAR company for providing the clams. We thank Adeline Bidault-Toffin, Nelly Le Goïc, Jérôme La Peyre, Romain Lavaud, Sébastien Artigaud, Malwenn Lassudrie, Camille Lacroix, Mélanie Mercier, Marc Long, and Mickael Perrigault for their help with sampling. We also thank Olivier Gauthier and Fabrice Pernet for their help with the statistical analysis. Special thanks are addressed to Anna Muir for linguistic revision.

References

- [1] Paillard C, Allam B, Oubella R. Effect of temperature on defense parameters in manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Org* 2004;59:249–62.
- [2] Byrne M. Impact of climate change stressors on marine invertebrate life histories with a focus on the Mollusca and Echinodermata. *Climate alert: climate change monitoring and strategy*. Sydney: University of Sydney Press; 2010. p. 142–85.
- [3] Byrne M. Global change ecotoxicology: identification of early life history bottlenecks in marine invertebrates, variable species responses and variable experimental approaches. *Mar Environ Res* 2012;76:3–15.
- [4] Harvell C, Kim K, Burkholder J, Colwell R, Epstein PR, Grimes D, et al. Emerging marine diseases—climate links and anthropogenic factors. *Science* 1999;285:1505–10.
- [5] Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS, et al. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 2002;296:2158–62.
- [6] Doney SC, Ruckelshaus M, Duffy JE, Barry JP, Chan F, English CA, et al. Climate change impacts on marine ecosystems. *Mar Sci* 2012;4.
- [7] Canesi L, Gallo G, Gavioli M, Pruzzo C. Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc Res Tech* 2002;57:469–76.
- [8] Paillard CA. short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat Living Resour* 2004;17:467–75.
- [9] Flassch J-P, Leborgne Y. Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and the effects on aquaculture production and natural settlement. In: *Introductions and transfers of aquatic species selected papers from a symposium held in Halifax, Nova Scotia, 12–13 June 1990*; 1992.
- [10] Flassch J-P, Barret J, Mazurie J, Maes P, Nicolas J, Noel T, et al. L'élevage de la palourde, programme national de recherche sur la maladie de l'anneau brun. *Les Mollusques Marins: Biologie et Aquaculture*. Brest Fr Nov 1990;9:1992.
- [11] Paillard C, Maes P. Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d'un *Vibrio* sp. *Comptes rendus de l'Académie des sciences Série 3. Sci La Vie* 1990;310:15–20.
- [12] Paillard C, Perceley L, Le Pennec M, Le Picard D. Origine pathogène de l'«anneau brun» chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). *Comptes rendus de l'Académie des sciences Série 3. Sci La Vie* 1989;309:235–41.
- [13] Park K-I, Paillard C, Le Chevalier P, Choi K-S. Report on the occurrence of brown ring disease (BRD) in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, on the west coast of Korea. *Aquaculture* 2006;255:610–3.
- [14] Matsuyama T, Sakai T, Kiryu I, Yuassa K, Yasunobu H, Kawamura Y, et al. First isolation of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease (BRD), in Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Japan. *Fish Pathol* 2010;45(2):77–9.
- [15] Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, Garcia MT, et al. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:480–4.
- [16] Paillard C, Maes P, Oubella R. Brown ring disease in clams. *Annu Rev Fish Dis* 1994;4:219–40.
- [17] Paillard C, Maes P. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *J Invertebr Pathol* 1995;65:91–100.
- [18] Paillard C, Maes P. Brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. *Dis Aquat Org* 1994;19:137–46.
- [19] 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.
- [20] Paillard C. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. *Habilitation à diriger des recherches (HDR)*. Brest: Université de Bretagne Occidentale; 2004.
- [21] Maes P. Pathologie bactérienne chez deux invertébrés marins d'intérêt commercial, *Ruditapes philippinarum* et *Paracentrotus lividus*. Brest: Université de Bretagne Occidentale; 1992.
- [22] Haberkorn H. Description des paramètres de croissance, de cytotoxicité et des caractéristiques sérologiques et génétiques d'une souche de *Vibrio* sp. thermotolérante. *Rapport de master*. Quimper: Université de Bretagne Occidentale; 2005.
- [23] Paillard C, Maes P, Mazurie J, Claude S, Marhic A, Le Pennec M. Epidemiological survey of the brown ring disease in clams of Atlantic coast: role of

- temperature in variations of prevalence. In: Proceedings of VIII symposium of the international society for veterinary epidemiology and economics; 1997. p. 32.
- [24] Rinkevich B, Müller WE. Invertebrate immunology. Springer-Verlag; 1996.
- [25] Casadevall A, Pirofski L-A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* 1999;67:3703–13.
- [26] Sparling PF. Bacterial virulence and pathogenesis: an overview. *Rev Infect Dis* 1983;5:S637–46.
- [27] Paillard C, Jean F, Ford SE, Powell EN, Klinck JM, Hofmann EE, et al. A theoretical individual-based model of Brown Ring Disease in Manila clams, *Venerupis philippinarum*. *J Sea Res* 2014;91:15–34.
- [28] Rodriguez-Lopez JN, Tudela J, Varon R, Garcia-Carmona F, Garcia-Canovas F. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J Bio Chem* 1992;267:3801–10.
- [29] Aladaileh S, Rodney P, Nair SV, Raftos DA. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Comp Biochem Physiology Part B Biochem Mol Biol* 2007;148:470–80.
- [30] Roulin A, Almasi B, Meichtry-Stier K, Jenni L. Eumelanin- and pheomelanin-based colour advertise resistance to oxidative stress in opposite ways. *J Evol Biol* 2011;24:2241–7.
- [31] Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol* 2008;29:263–71.
- [32] Muñoz P, Meseguer J, Esteban M. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish Shellfish Immunol* 2006;20:12–9.
- [33] Butt D, Raftos D. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Dev Comp Immunol* 2008;32:299–306.
- [34] Luna-Acosta A, Saulnier D, Pommier M, Haffner P, De Decker S, Renault T, et al. First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytocytes. *Fish shellfish Immunol* 2011;31:795–800.
- [35] Manduzio H, Rocher B, Durand F, Galap C, Leboulenger F. The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ* 2005;2:91–104.
- [36] 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.
- [37] Jensen S, Samuelsen OB, Andersen K, Torkildsen L, Lambert C, Choquet G, et al. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Dis Aquat Org* 2003;53:25–31.
- [38] Choquet G. Caractérisation et pathogénie des isolats de *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise. Brest: Université de Bretagne Occidentale; 2004.
- [39] Corporeau C, Vanderplancke G, Boulais M, Suquet M, Quéré C, Boudry P, et al. Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Proteomics* 2012;75:5554–63.
- [40] Guévelou E, Huvet A, Galindo-Sánchez CE, Milan M, Quillien V, Daniel J-Y, et al. Sex-specific regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Biol Reprod* 2013;89:1–15.
- [41] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [42] Le Bris C, Paillard C, Stiger-Pouvreau V, Guérard F. Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum*: Characterization and kinetic properties. *Fish & shellfish immunology* 2015;42:16–24.
- [43] Team RC. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: Computing RFS; 2013.
- [44] Faria JC, Jelihovschi E, Allaman IB. TukeyC: conventionnal tukey test. R package version 1.1-0. 2012.
- [45] Venables WN, Ripley BD. Modern applied statistics with S. 4th ed. New York: Springer; 2002.
- [46] Fox J, Weisberg S. An {R} companion to applied regression. 2nd ed. Oaks, CA: Thousand; 2011.
- [47] Solidoro C, Pastres R, Melaku Canu D, Pellizzato M, Rossi R. Modelling the growth of *Tapes philippinarum* in Northern Adriatic lagoons. *Mar Ecol Prog Ser* 2000;199:137–48.
- [48] Flye-Sainte-Marie JG. Ecophysiology of brown ring disease in the manila clam *Ruditapes philippinarum*, experimental and modelling approaches. Brest: Université de Bretagne Occidentale; 2007.
- [49] Fisher WS. Environmental influence on bivalve hemocyte function. *Am Fish Soc Spec Publ* 1988;18:225–37.
- [50] Yang H, Yuan X, Zhou Y, Mao Y, Zhang T, Liu Y. Effects of body size and water temperature on food consumption and growth in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) with special reference to aestivation. *Aquac Res* 2005;36:1085–92.
- [51] Chu F-LE, La Peyre JF. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*: temperature effects. *Dis Aquat Org* 1993;16:223.
- [52] Liu X, Ji C, Zhao J, Wu H. Differential metabolic response of clam *Ruditapes philippinarum* to *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* challenges. *Fish Shellfish Immunol* 2013;56:72–80.

2.3 Conclusions de l'expérimentation 1

L'expérimentation 1 visait à caractériser d'une part, le développement de la MAB et, d'autre part, la réponse immunitaire suite à une infection par deux souches de *V. tapetis a priori* contrastées en termes de virulence en association à un challenge thermique. **Les résultats de cette expérimentation ont montré que l'augmentation de la température de 14 à 22 °C conduisait à une prévalence, une intensité de la MAB (CDS) plus faibles et à des stades de réparation coquillères (SRS) plus élevés quelle que soit la souche considérée.** Ces résultats traduisent d'une part une baisse de la virulence de la souche CECT4600T à 22 °C et également une baisse moins sensible de la virulence de la souche LP2. De plus, l'augmentation des stades de réparation à 22 °C semble indiquer que les capacités immunitaires des palourdes sont nettement améliorées à cette température quelle que soit la souche considérée. Ainsi, de manière globale, nos résultats vont dans le sens d'une amélioration générale de la condition immunitaire des animaux résultant en une diminution de la prévalence et de l'intensité de la MAB à 22 °C et ce, quelle que soit la souche de *V. tapetis*.

D'autre part, les résultats obtenus mettent en avant une augmentation des activités basales de la PO dans le manteau et dans l'hémolymphe et de la SOD dans le manteau à 22 °C, ce qui va également dans le sens d'une amélioration des capacités immunitaires à cette température. **De plus, un effet « souche » de *V. tapetis* est observé pour les activités PO dans l'hémolymphe et SOD dans le manteau à 30 jours post-injection à 15 °C.** En effet, ces activités sont alors augmentées chez les animaux injectés avec la souche CECT4600^T par rapport aux animaux témoins et ceux qui ont été injectés avec la souche LP2 à 15 °C. Cet effet pourrait notamment s'expliquer par la différence de virulence entre les deux souches à cette température. **En revanche, à 22 °C, l'effet « souche » n'est plus observé alors qu'un effet « bactérie » est visible pour les activités PO dès 3 jours post-injection dans l'hémolymphe et SOD dans le manteau à 30 jours post-injection.** Ce résultat nous amène à penser qu'il n'y a plus de différences de virulence entre les deux souches à 22 °C. De plus, l'intensité de la maladie (CDS) étant similaire quelque soit la souche de *V. tapetis* considérée à 22 °C, et plus faible qu'à 15 °C chez les individus injectés avec la souche CECT4600^T. On peut donc conclure que l'évaluation des activités SOD du manteau et PO de l'hémolymphe apporte des éléments d'information sur une perte de pathogénicité de la souche CECT4600 à 22 °C.

2^{ème} partie

**Effet du régime algal et du statut de
reproduction de *Ruditapes
philippinarum* sur le développement
de la maladie de l'anneau brun**

1. Introduction

Nous avons vu dans la partie précédente que le développement de la maladie de l'anneau brun (MAB) était particulièrement dépendant de la température du milieu. En effet, la MAB est considérée comme une « maladie d'eau froide », généralement associée à un développement accru aux périodes hivernales. Ces périodes sont également caractérisées par de plus faibles concentrations en micro-algues, qui sont la ressource trophique principale des palourdes. Ainsi, les premières études qui ont évalué l'influence de facteurs externes sur le développement de la MAB ont mis en évidence que la ressource trophique était un paramètre crucial (Plana & Le Pennec, 1991; Plana et al., 1996). En effet, ces études ont montré que les animaux à jeun présentaient une susceptibilité plus importante à l'infection par *V. tapetis* que les animaux nourris.

Par ailleurs, la qualité des micro-algues de fourrage en termes de composition en acides gras peut influencer de nombreux processus biologiques chez les bivalves. Plus particulièrement, les acides gras polyinsaturés (AGPI) tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA ; 20:5n-3), l'acide docoséhexaénoïque (DHA ; 22:6n-3) et l'acide arachidonique (AA ; 20:4n-6) sont essentiels pour les processus de survie (Da Costa et al., 2012; Aranda-Burgos et al., 2014), de reproduction (Soudant et al., 1996a), de croissance (Caers et al., 1999), de développement post-embryonnaire (Pernet & Tremblay, 2004) et plus généralement pour la santé (Delaporte et al., 2006) des mollusques bivalves.

L'étude menée par Delaporte et al. (2003) a comparé l'effet de deux régimes monoalgaux contrastés en termes de composition en AGPI sur les paramètres hématologiques de *R. philippinarum*. Les microalgues utilisées au cours de leur expérimentation étaient *Chaetoceros calcitrans*, riche en AA et en EPA et pauvre en DHA, et *T-Isochrysis aff. galbana*, clone Tahitien (*T-Iso*) qui est riche en DHA et pauvre en AA et en EPA. Leur étude a montré que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), les taux de phagocytose des hémocytes ainsi que la concentration en hémocytes circulants totale (CHT) des palourdes nourries avec *C. calcitrans* étaient plus importants comparé à celles nourries avec *T-Iso*. **Partant du résultat de cette étude, nous nous sommes d'abord demandé si l'augmentation des paramètres hématologiques de palourdes nourries avec *C. calcitrans* pourrait induire une meilleure défense lors d'une infection expérimentale par *V. tapetis* par rapport aux**

animaux nourris avec T-Iso. Afin de répondre à cette problématique, plus de 2000 palourdes adultes provenant de Marennes ont été récoltées en mai 2015 et ont été conditionnées pendant une période de 4 semaines aux deux régimes monoalgaux T-Iso et *C. calcitrans*. Ces conditions expérimentales ont été fixées pour correspondre au maximum à celles utilisées dans l'étude de Delaporte et al. (2003). Suite à cette période de 4 semaines, une partie des palourdes a été injectée avec *V. tapetis* ou avec de l'eau de mer filtrée stérile (« témoins injectés ») en cavité extrapalléale et enfin une autre partie des palourdes n'a pas été injectée et correspond au « témoin nutrition ».

Par ailleurs, étant donné que les palourdes utilisées pour cette expérimentation ont été récoltées en mai, la plupart d'entre elles étaient entrées en gamétogénèse. Or, le statut de reproduction des invertébrés marins peut également influencer le développement d'interactions hôte-pathogène en tant que facteur interne. En effet, la gamétogénèse étant un processus nécessitant une grande quantité d'énergie chez l'hôte, il peut conduire à un affaiblissement de ses défenses contre les attaques d'agents pathogènes, spécialement au moment des pontes (Delaporte et al., 2007; Travers et al., 2009; Wendling and Wegner, 2013).

Ainsi, la deuxième problématique associée à cette expérimentation était de savoir si le statut de reproduction de *R. philippinarum* pouvait influencer le développement de la MAB. Cette question n'avait jamais été abordée dans le cadre d'infections expérimentales de la palourde par *V. tapetis*. Cependant, en milieu naturel, les prévalences des populations naturelles et exploitées peuvent être maximales en mai ou juin selon les sites et les années (Paillard, 2004b). Ainsi, pour cette expérimentation, les palourdes ont été sexées et le stade de maturité a été déterminé pour chaque animal prélevé afin de tester ces paramètres comme facteurs internes pouvant affecter le développement de la maladie.

Dans cette étude, l'influence du régime algal et du statut de reproduction des animaux sur le développement de la MAB a été évalué à l'aide de la prévalence, de l'intensité de la maladie, des stades de réparations. Par ailleurs, les paramètres hématocytaires de *R. philippinarum* ont été mesurés afin de définir son statut immunitaire et la charge en *V. tapetis* a été quantifiée dans les fluides extrapalléaux des animaux.

2. Article 2

“Brown Ring Disease in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: effect of algal diet quality and reproduction status” – soumis à PLOS ONE en Novembre 2015.

Brown Ring Disease in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: effect of algal diet quality and reproduction status

Richard Gaëlle^{1*}, Philippe Miner², Adeline Bidault¹, Fabrice Pernet², Charlotte Corporeau², Pierre Boudry², Fabienne Guérard¹, Christine Paillard^{1¶}, Christophe Lambert^{1¶}

¹ : UMR 6539 CNRS UBO IRD IFREMER, LEMAR – IUEM – UBO, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise – Rue Dumont d’Urville, 29280 Plouzané, France.

² : Ifremer, UMR 6539 LEMAR (CNRS/UBO/IRD/Ifremer), Technopôle Brest-Iroise CS 10070, 29280 Plouzané, France.

* Corresponding author

E-mail: gaelle.richard@univ-brest.fr

¶: These authors contributed equally to this work

Abstract

Aquaculture of marine bivalves frequently undergoes bacterial infections such as vibriosis. Among them, the Brown Ring Disease (BRD) affects the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, and is caused by the pathogenic bacterium *Vibrio tapetis*. Although fasting has been shown to induce higher BRD prevalence and intensity, diet quality effect remained to be explored. The aim of our study was to investigate BRD development in Manila clam experimentally challenged with *V. tapetis* in association with two mono-algal diets, characterized by their contrasted fatty acid composition (*T-iso* and *Chaetoceros calcitrans*). After four weeks of algal conditioning, clams were either injected in peripheral extrapallial cavity with *V. tapetis* or filtered sterile seawater or not injected. Disease prevalence and intensity, as well as host haemocytes parameters and pathogens burden in extrapallial fluids were monitored during 30 days post injection (dpi). Additionally, sex and sexual maturity were determined in clams and tested as internal parameters influencing BRD development.

BRD development was mainly influenced by *V. tapetis* exposition but not by algal diet quality. Bacterial infection progress was characterized by two phases in *V. tapetis*-injected clams. During the first week of exposure to pathogen, BRD prevalence and *V. tapetis* burden in extrapallial fluids increased. From 7 to 30 dpi, BRD prevalence reached 90 % and BRD intensity increased as well as shell repair process which was maximal at 30 dpi, while *V. tapetis* load decreased. Although algal diet quality did not impact clams response facing *V. tapetis*, sufficient food supply might have contributed to the relative good health of challenged clams that fully recovered from BRD. Interestingly, host reproductive status impacted BRD intensities likely reflecting an energetic trade-off between reproduction process and immune response towards *V. tapetis*.

Keywords

Ruditapes philippinarum, *Vibrio tapetis*, reproductive status, nutrition, immunity.

1. Introduction

Shellfish aquaculture is frequently affected by disease outbreaks caused either by protozoans, bacteria or viruses and eventually leading to severe mortalities (Paillard et al., 2004b; Sauvage et al., 2009; Soudant et al., 2013; Raftos et al., 2014). The case study of Brown Ring Disease (BRD) in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, has been widely documented since the mass mortalities events in late 1980s (Paillard and Maes, 1995a, 1995b). The causative agent of BRD, *Vibrio tapetis* (bacteria), colonizes and alters the periostracal lamina of its host which in turn secretes a brown conchiolin deposit on the inner shell to embed the bacteria (Paillard et al., 1994). While infection progresses, this organic deposit becomes thicker and clam forms concomitantly new calcified layers on the deposit to repair the shell (Paillard et al., 1994). Finally, if tissues are injured, *V. tapetis* enters circulatory system of *R. philippinarum*, multiplies, which generally leads to death (Allam et al., 2002; Paillard, 2004a).

External parameters such as abiotic factors are known to influence the outcome of this host-pathogen relationship (Paillard et al., 2004a, 2014). Temperature and salinity were shown to be negatively correlated with BRD prevalence and intensity, which is consistent with a disease thriving during winter period (Paillard et al., 2004a; Reid et al., 2003; Richard

et al., 2015). Effect of sediment grain-size was also explored, pointing out that larger grains enhance BRD development by lodging in shell opening (Flye-Sainte-Marie et al., 2008).

Few studies implied external biotic parameters in frame of BRD development, such as the harmful alga *Alexandrium tamarense* (Bricelj et al., 2011) or parasitism by the trematode *Himasthla elongata* (Paul-Pont et al., 2010). Starvation experiments pointed out that absence of trophic resource, i.e. living microalgae, was an aggravating factor in Manila clams infected with *V. tapetis* (Plana and Le Pennec, 1991; Plana et al., 1996).

Food quality in terms of fatty acids composition is known to impact many biological processes in bivalves. Indeed, polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5n-3), decosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) and arachidonic acid (AA; 20:4n-6) are essential for survival, reproduction, growth or health in bivalves (Soudant et al., 1996a; Caers et al., 1999; Pernet et al., 2004; Delaporte et al., 2006; Da Costa et al., 2012; Andres Aranda-Burgos et al., 2014). Moreover, these PUFAs impact immune abilities in bivalves, especially haemocytes parameters such as total haemocyte count (THC) in haemolymph, reactive oxygen species (ROS) production, phagocytic rate (Delaporte et al., 2003) and mitochondrial membrane potential (Dudognon et al., 2014). For instance, Delaporte et al. (2003) showed that clams fed *Chaetoceros calcitrans* rich in 20:4n-6, 20:5n-3 and poor in 22:6n-3 displayed higher haemocyte concentrations, ROS production and phagocytic rates than animals fed *T-Isochrysis aff. galbana*, clone Tahitian (*T-Iso*) which is rich in 22:6n-3 and poor in 20:4n-6, 20:5n-3.

Disease development in mollusks is also influenced by internal parameters of the host such as its reproductive status (Travers et al., 2009) and more generally its condition index (Paillard, 1992; Flye-Sainte-Marie et al., 2007) and parameters specific of the pathogen such as its virulence (Choquet et al., 2003; Le Bris et al., 2015). For example, several studies showed that gametogenesis process was associated to weakened immune defenses against pathogens in marine invertebrates, especially at spawning periods (Delaporte et al., 2007; Travers et al., 2009; Wendling and Wegner, 2013) or to genetically based variation of resistance (Huvet et al., 2010). However, impact of host reproductive status on BRD remains unexplored so far.

The objectives of the present study were to characterize BRD development through an experimental *V. tapetis* challenge in *R. philippinarum* in relation with (1) algal diet quality using two microalgae, namely *T-Iso* and *C. calcitrans*, chosen because of their contrasted PUFAs compositions and (2) host reproductive status. More precisely, we examined BRD development through the monitoring of disease prevalence and intensity, host immune status via haemocytes parameters, and pathogen load in extrapallial fluids (EF).

2. Material and methods

2.1. Experimental design and sampling

Experimental design and sampling are summarized in Fig 1.

2.1.1. Origin and conditioning of clams

Two year old clams were harvested in the Marennes-Oleron Bay (Charente Maritime, France) on May 5th, 2014. A first visual health diagnostic was performed on 50 clams *in situ* and no BRD clinical signs were observed. Clams were then transferred to Ifremer facilities in Plouzané (Finistère, France) and held in a 6-day quarantine with a chloramphenicol (8 mg.L⁻¹) treatment to avoid local contamination.

After quarantine, animals were randomly divided and maintained in trays placed in 18 100L-tanks equipped with air-lift systems (100 clams per tank). Water temperature was maintained at 13°C during the whole experiment so that infection by *V. tapetis* was favored (Paillard et al., 2004a). Tanks were continuously supplied with filtered sterile seawater (FSW, filtered at 1 µm and UV-sterilized) at a renewal rate of 50 % per day and cleaned every two days.

Two mono-algal diets were used to feed clams during the whole experiment: *T-iso* and *C. calcitrans*. Those algae were chosen because of their common use in shellfish hatcheries and particularly because of their contrasted fatty acids composition (Delaporte et al., 2003): *T-Iso* rich in 22:6n-3 and poor in 20:4n-6, 20:5n-3; *C. calcitrans* rich 20:4n-6, 20:5n-3 and poor in 22:6n-3. *T-iso* was cultured semi-continuously in Conway medium; *C. calcitrans* was batch-cultured in Conway medium with addition of metasilicates at a final concentration

of 40 mg per liter of FSW (Tompkins et al., 1995). Both cultures were maintained at 18°C, pH 8.1 and with 24-hour light; they were harvested from 200L-cylinders when reaching the stationary phase. Algal concentrations were determined using Malassez cell. Clams were daily fed with an algal ration established at 3% algal dry weight per clam dry weight, corresponding to the maintenance ration (Helm et al., 2004). Daily supply was around $0.5 \cdot 10^9$ cells of *T-iso*/individual/day (9 tanks) and $0.2 \cdot 10^9$ cells of *C. calcitrans*/individual/day (9 tanks) and was adjusted if necessary thanks to peristaltic pumps. Algal-conditioning ran for four weeks, which is supposed to be a sufficient time to ensure the fatty acids signature in clams tissues for each alga (Delaporte et al., 2005). This was verified by analyzing neutral lipids fatty acids composition in algae and in clams digestive glands at the end of algal-conditioning period as previously described in Marty et al. (1992). Indeed, fatty acid composition of clams neutral lipids clearly mirrored the fatty acid composition of the diet, in particular in terms of essential PUFAs i.e., 20:4n-6, 20:5n-3 and 22:6n-3 (data not shown).

2.1.2. Bacterial challenge

Bacterial strain

V. tapetis CECT4600^T strain, isolated from diseased *R. philippinarum* in 1990 in Brittany (France) was cultured in Zobell's medium overnight at 18°C (Paillard and Maes, 1994, 1995a, 1995b). Bacterial concentration was spectrophotometrically determined at 490nm (Le Bris et al., 2015).

Experimental infection

After algal-conditioning, clams from 12 tanks (6 *T-iso* tanks and 6 *C. calcitrans* tanks) were exposed to air twelve hours in the experimental room, thus facilitating valve opening when replaced into water just before injections. For each alga condition, clams from three tanks were injected with 100µL of CECT4600^T *V. tapetis* suspension (10^7 UFC.mL⁻¹) in peripheral extrapallial cavity as described in Le Bris et al. (2015). Clams from the three remaining tanks for each alga were used as control clams, being injected with 100µL of FSW (sterilized at 120 °C for 20 min and filtered at 0.2 µm), serving as control injection. After injections, animals were kept 6 h out of seawater before being replaced into their tanks in

order to favor bacterial colonization on the periostracal lamina, as in the standard protocol developed for pallial cavity infection (Paillard and Maes, 1990).

Given the high number of injections (1200 clams), half of the clams were injected one day and the other half the next day. Subsequently, clams were separated in the different tanks by a physical barrier indicating the day of injection.

In the 6 remaining tanks (3 tanks for each alga condition), clams were not injected so that we could assess the effect of injection alone.

Sampling of clams

180 clams (10 per tank) were sampled at five different dates (900 clams sampled in total): 0 (just before injections), 2, 7, 14 and 30 days post injection (dpi). A supplementary sampling was performed at 1 dpi for *V. tapetis* burden analysis in extrapallial fluids (EF). These times were doubled so that half of the clams at one time were sampled one day and the other half the next day. The subsequent bias induced by day of sampling was statistically treated as a blocking factor in the different statistical models (see section 2-6).

Shells of clams were collected at each sampling time, 180 clams (10 per tank), for brown ring disease (BRD) diagnosis, i.e., BRD prevalence and intensity (see section 2.2.1). Additionally, EF of 36 clams (2 per tank) were collected at 0, 1, 2, 7, 14 and 30 dpi for analysis of *V. tapetis* burden. Briefly, EF were withdrawn by placing sterile 1mL syringe fitted on a 25-gauge needle between the mantle and the shell. These fluids were then placed into 2mL DNA-free microtubes and flash-frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C until further analyses (see section 2.2.2).

Clams meat and shell were collected on 400 clams in total: at arrival (50 clams), at the end of algal diet conditioning, i.e. at 0 dpi (104 clams) and at the end of the experiment i.e. at 30 dpi (246 clams) in order to assess condition index (see section 2.3).

Haemocyte parameters, namely viability, total haemocyte count (THC), size, complexity, phagocytic rate and reactive oxygen species (ROS) production, were evaluated in the 180 clams collected at each sampling time. Briefly, haemolymph was withdrawn through the hinge directly from clam adductor muscle using a sterile 1mL syringe fitted on a 25-

gauge needle. The resulting samples were examined under light microscopy for quality control, filtered through a 80µm mesh and held on ice until flow cytometry analyses (see section 2.4).

Finally, sex and sexual maturity were assessed in all clams (180 clams at each sampling time). Briefly, sections of gonadal tissue were collected for each individual and fixed into Davidson fluid (Shaw and Battle, 1957) for 24 hours, before transfer into 70% ethanol solution until analysis (see section 2.5).

2.2. Brown ring disease diagnosis

2.2.1. Prevalence, conchiolin deposit and shell repair intensities

For BRD prevalence and clinical signs intensities analyses, inner shells of each clam were photographed using a 50-mm CANON macroscopic lens. These pictures were then analyzed using Visilog 6.6 image analysis software, according to Paillard and Maes (1994) methodology, adding a new quantitative index for shell repair. Surfaces of whole shell (S_{WS}), surface of brown ring deposit (S_{BRD}) and surface of shell repair (S_{SR}) were estimated to create two types of indexes, namely the deposit surface index and the shell repair index (Fig 2). These parameters respectively account for disease development intensity and disease recovery intensity and were calculated as follows:

$$DSI = 100 \times (S_{BRD}/S_{WS}) \quad \& \quad SRI = 100 \times (S_{SR}/S_{BRD})$$

DSI: Deposit Surface Index as a percentage of shell surface affected by BRD

SRI: Shell Repair Index as a percentage of deposit surface repaired

Subsequently, clams were classified as BRD+ when BRD occurrence was equal to 1 (visible conchiolin deposit) and BRD- when BRD occurrence was null (no visible clinical signs). Prevalence was then evaluated as the proportion of BRD+ among experimental clams at a defined sampling time.

2.2.2. *Vibrio tapetis* enumeration in extrapallial fluids (EF)

Total DNA extraction

Total DNA was extracted from clams EF using the QIAgen QIAamp DNA mini kit (QIAgen®) according to the manufacturer instructions. Briefly, 450µL of EF were centrifuged at 10.000g during 10 minutes at 4°C. The resulting pellets were digested by addition of 20 µL proteinase K (40 mU/mg) and 180 µL of tissue lysis buffer (ATL) at 56°C during one hour. DNA was extracted using the QIAamp Mini spin columns and final elution of DNA was performed in 200µL of milliQ water.

DNA concentrations and quality were assessed using ND 1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies); samples were then stored at -20°C until use.

Quantification of *V. tapetis* in EF by Real-time PCR

V. tapetis DNA quantification was carried out using the qPCR protocol of Bidault et al. (in rev.). Real-time PCR was performed on a LightCycler 480® Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using LightCycler 480® Probe Master Mix based on Taqman detection (Roche® Diagnostics). Each reaction was technically repeated in triplicates, in a final volume of 15µL: 5µL of DNA template, 2.5 µL of a solution containing primers (0.5 µM) and of hydrolysis probe virB4-P1 (0.1 µM), and 7.5µL of LC480 Probe Master Mix 2X. Amplification reactions started with an initial denaturation at 95 °C for 10 min and then consisted in 45 cycles of the following steps: (1) Denaturation: 95 °C for 10 sec- (2) Annealing: 54 °C for 20 sec - (3) Fluorescence assessment: 72 °C for 1 sec. Finally, a cooling step at 40 °C during 10 sec was operated.

The results were analyzed with the Roche LightCycler® 480 software and absolute quantification was performed using a standard curve obtained with serial dilution from purified CECT4600^T *V. tapetis* DNA (Bidault et al., in rev.). Results are expressed as the number of *V. tapetis* cells per mL of EF.

2.3. Condition index

Dry flesh weight and dry shell weight were measured after an incubation of clams meat and shell for 48 h in an oven at 60 °C. Condition index (CI) was estimated as a general bioindicator of apparent health in bivalves (Lucas and Beninger, 1985) using dry flesh weight: dry shell weight ratio (Walne, 1976).

2.4. Haemocytes parameters

Haemocytes viability, total count, complexity, size and ROS production were quantified for each individual using a FACScalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA) equipped with a 488nm argon laser. Haemocytes phagocytic rate was assessed using a FACSverse flow cytometer (Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA). Samples cytograms were then analyzed using BD FACSuite™ software.

Haemocytes parameters were analysed as described for oyster haemocytes in Haberkorn et al. (2010), adapted for clam haemocytes (considered as one single population instead of three sub-populations for oysters), with one modification: Sybr-Green I was used in the present work at 1/10.000 of the DMSO commercial solution, final concentration, instead of 1/1.000.

Haemocytes viability is assessed as the percentage of dead haemocytes in the circulating hemolymph; Total haemocyte count is given in cell per mL of circulating hemolymph; mean size and complexity of haemocytes are given using respectively the forward scatter (FSC) and the side scatter (SSC) values of the flow cytometer (in arbitrary unit, A.U.); Phagocytosis is given as a phagocytic rate, i.e. the percentage of active haemocytes in the circulating hemolymph: active cells are cells able to phagocyte 3 latex beads (2µm) or more within 2 hours at 18°C. ROS production is expressed as the mean level of green fluorescence (500-530 nm) of haemocyte, in arbitrary unit: this green fluorescence is directly linked to the oxidation of DCFH to DCF by reactive oxygen species.

2.5. Reproductive parameters

Gonadal tissues were dehydrated in ascending ethanol solutions, cleared using Claral® (a xylene substitute) and embedded in paraffin. Sections of 5 µm were cut using a microtome, stained with Harris hematoxylin and eosin (Howard et al., 1983) and mounted on glass slides which were examined under light microscope.

Sex and sexual maturity stages were then determined using Drummond et al. (2006) classification key: Stage 0: Resting (undifferentiated); Stage 1: Early Developing; Stage 2: Late Developing; Stage 3: Ripe Gonad; Stage 4: Partially Spent; Stage 5: Spent/Resorbing. Figs 3 represent photomicrographs of the different stages encountered in this study. Sex and sexual maturity were almost always successfully determined for each clam as only few individuals were at undifferentiated stage (stage 0). However, a unique case of hermaphroditism was noticed and subsequently removed from our dataset for the different statistical analyses.

2.6. Statistical analysis

Generalized Linear Mixed effects Model (GLMM) was used to test the effects of diet (fixed factor with two levels: *T-Iso* and *C. calcitrans*), injection condition (fixed factor with three levels: *V. tapetis*, FSW and no injection), time (fixed factor with five levels: 0, 2, 7, 14 and 30 days) on BRD occurrence in animals. Two covariates were also incremented in the model: sex (two-level categorical variable: male or female) and sexual maturity (four-level categorical variable: stages 1, 2, 3 and 4). Random effect of this GLMM was the blocking factor constituted by the sampling day (two-level factor: first and second day of the different sampling times). As BRD occurrence is a discrete binary variable, binomial family was chosen for GLMM implementation in association to the logit link-function to achieve the logistic regression. Results are given as predicted probabilities resulting from GLMM modeling.

More precisely, calculation of the predicted probabilities was achieved using the following simplified expression:

$$P(BRD = 1) = \text{logit}^{-1}(\hat{\alpha} + \sum_i \hat{\beta}_i P_i + \hat{\gamma}R + \varepsilon)$$

Where $P(BRD = 1)$ is the probability for a given animal to develop BRD clinical sign at given predictor variables values; logit^{-1} is the inverse of link function logit used in GLMM; $\hat{\alpha}$ is the regression intercept; $\hat{\beta}_i$ are fixed-effects regression coefficients and $\hat{\gamma}$ is the random-effects regression coefficient; P_i are the predictor variables (time, injection condition, diet, interaction of time and Injection condition); R is the regression random effect term; ε is the regression residuals term.

In other terms, as $P(BRD = 1)$ represents the proportion of BRD+ clams among the experimental clams, these predicted probabilities also stand for BRD prevalence by definition.

Linear Mixed effects Models (LMM) were achieved for all quantitative variables (DSI, SRI, haemocytes parameters and *V. tapetis* concentrations) to assess effects of diet, injection condition and time. For DSI and SRI analyses, only BRD+ were considered as these parameters are null in BRD-. Likewise, sex, sexual maturity stages and BRD occurrence (for haemocytes parameters and *V. tapetis* concentrations) were tested as covariates; blocking factor (first and second day of the different sampling times) was considered as random effects of the model.

Backward stepwise GLMM and LMM, starting from the saturated model, were used to determine the significance of our predictors (injection, diet, time, sex, sexual maturity stages and BRD occurrence). Where significant effects were observed, LS-means tests were used as post-hoc.

Effects of diet conditioning, injection condition, BRD occurrence and their interactions on condition index were evaluated using a three-way analysis of variance (ANOVA).

Additionally, another GLMM (logistic regression) was achieved on sex maturity data in order to verify that sex ratios were not affected by the different tested conditions. Also,

combination of sex and sexual maturity stages, which are categorical data with more than two levels, was tested through a multinomial logistic regression for the same reasons. Significant differences for each condition were calculated using likelihood ratio tests.

Statistical analyses were carried out using R 3.1.2 Software (R Core Team, 2011). GLMM and LMM were achieved using respectively *glmer* and *lmer* functions from the lme4 package (Bates et al., 2013). The *multinom* function from nnet package was used for multinomial regression (Venables and Ripley, 2013). All plots were drawn using ggplot2 package (Wickham and Chang, 2015).

3. Results

3.1. BRD development: effects of *V. tapetis* exposition and algal diet quality

3.1.1. BRD prevalence

Although BRD occurrence was not influenced by algal diet, sex and sexual maturity, it was significantly impacted by injection condition over time (GLMM; $R^2 = 0.49$; LR $\chi^2 = 54.03$; $p < 0.0001$). In clams injected with *V. tapetis* BRD prevalence (predicted probabilities resulting from GLMM) set off between 2 and 7 dpi rising from ca. 8 to 80 % and reached the maximal value of ca. 90 % at 14 dpi (Fig 4). BRD prevalence was similar over time in clams injected with FSW or not injected, reaching maximal values of ca. 30 % at 30 dpi.

3.1.2. Conchiolin deposit development and shell repair intensities

Conchiolin deposit development intensity – DSI

Although algal diet and sex did not affect DSI, conchiolin deposit development was influenced by the interaction of injection condition, time and host sexual maturity (LMM, $F = 7.62$; $p < 0.01$). For a better comprehension of these multiple effects, DSI results were firstly examined in relation with time and injection, and secondly with special regards to sexual maturity of clams as the interaction of these factors with host sexual maturity were significant only at 30 dpi in *V. tapetis*-injected clams (see section 3-3).

Although DSI values showed a high inter-individual variability among all BRD+, these variations were not associated to any particular trend over time in clams injected with FSW or not injected (Table 1). Despite the variability observed between individuals in DSI of clams injected with *V. tapetis*, this parameter followed the same trend as BRD prevalence *i.e.*, an increase between 7 dpi and 30 dpi (Table 1). More precisely, DSI were twice higher at 30 dpi than at 7 dpi in clams injected with *V. tapetis* (LS-means; $p_{\text{adjusted}}=0.02$).

Shell repair intensity – SRI

Shell repair indexes were not influenced by algal diet, injection condition, sex, sexual maturity stages or their interactions. Interestingly, SRI increased over time in clams among all injection conditions from ca. 70 % at 2 dpi to ca. 100 % at 30 dpi (LMM, $F = 2.59$; $p = 0.05$). Moreover, SRI values displayed an important variability between 2 and 7 dpi and reached the maximal values between 14 and 30 dpi (Table 1). Despite variability, clams SRI followed the same trends over time whatever the injection condition, reflecting similar shell repair abilities between clams.

3.1.3. *Vibrio tapetis* burden in EF

Pathogen loads in EF were greatly influenced by time, injection condition and BRD occurrence interaction (LMM, $F = 2.63$; $p = 0.017$). More precisely, bacteria detection of *V. tapetis* in EF was higher in clams injected with *V. tapetis* (25 detections) than with FSW (14 detections) or not injected (3 detections). Additionally, *V. tapetis* burden in EF was markedly affected by BRD occurrence according to sampling time in clams injected with *V. tapetis* (Fig 5). Indeed, *V. tapetis* was majorly present at 1 and 2 dpi in EF of BRD- and its load was significantly increased between these samplings times in these clams (LS-means, $p_{\text{adjusted}}=0.04$). At 7 dpi, most of the clams were BRD+ but only one out of twelve was *V. tapetis*-positive with a concentration close from detection threshold. The only one BRD- that was *V. tapetis*-positive was associated to the highest burden in EF. From 14 to 30 dpi, pathogen was only detected in BRD+ and its concentration in EF tended to decrease.

Surprisingly, high concentrations of *V. tapetis* were observed in half of the clams injected with FSW at 1 dpi, likely due to an injection effect that could have “helped” present bacteria to enter EF. However, bacteria loads in clams injected with FSW decreased as soon

as 2 dpi until 30 dpi. Except for this particular effect, only few clams injected with FSW or not injected were positive for *V. tapetis* detection and if so, bacteria load in EF remained relatively low over time.

3.1.4. Host condition index

Clams condition indexes were similar at arrival, after algal conditioning and 30 dpi among all conditions (Table 2).

3.1.5. Host immune parameters

Haemocytes size, complexity, viability as well as total haemocytes count (THC) were not influenced by injection condition, algal diet, time, sex, sexual maturity, BRD occurrence or their interactions (Table 1).

Conversely, haemocytes functional variables were influenced by injection, whether it was with *V. tapetis* or with FSW (Table 1). Indeed, phagocytic rate was ca. 5 % higher in injected than in not injected animals during the whole experiment (LMM, $F = 12.55$; $p = 4.76 \times 10^{-6}$). Additionally, ROS production increased by ca. 10 % in haemocytes of injected animals compared to non-injected clams but only 7 dpi. (LMM, $F = 3.89$; $p = 0.022$).

Overall, these results reflect similar immune defense between animals injected with *V. tapetis* and controls (FSW or non-injected) and fed T-Iso or *C. calcitrans*.

3.2. BRD development: effect of host reproductive status

3.2.1. Host reproductive status during experiment

Clams sex ratio (M:F, 1.5:1.0) and maturity stages for each sex were not significantly different among all conditions during the 30 days of the experiment (Fig 6). This result likely reflects that algal diet and BRD development did not impact reproduction process during the experiment.

3.2.2. BRD intensities in relation with host sexual maturity

In order to assess sexual maturity effect on BRD intensity, LMM analysis was achieved on clams injected with *V. tapetis* at 30 dpi, a condition that allows the observation of a sufficient number of BRD+ with varying degrees of BRD intensities. The results of this analysis clearly shows that DSI of clams challenged with *V. tapetis* increases concomitantly with sexual maturity stages at 30 dpi (LMM, $F = 9.9$; $p = 0.00023$). Indeed, DSI of clams at the two earlier maturity stages (1 and 2) were almost twice lower than DSI of clams at the two more advanced maturity stages (3 and 4) (Fig 7).

The same analysis was performed for SRI but contrarily to DSI, this parameter was not affected by sexual maturity and reached a value of ca. 100 % among all maturity stages in clams injected with *V. tapetis* at 30 dpi (Fig 7).

4. Discussion

The first objective of our study was to characterize BRD development in the Manila clam examining prevalence, intensities, pathogen burden and host immune defense in association with algal diet quality. Secondly, we investigated the role of host reproductive status (sex and sexual maturity) as an internal factor on BRD development in clams.

4.1. BRD development in control clams

BRD prevalence in clams injected with FSW or not injected (*i.e.* control clams) reached ca. 30 % at 30 dpi. This relatively low prevalence is likely due to the usual evolution of BRD when clams are not *V. tapetis*-free at the beginning of infection experiments as previously reported by Richard et al. (2015). Additionally, this prevalence is consistent with that observed in natural populations (Paillard and Maes, 1994; Soudant et al., 2004). Although values of DSI in control clams were highly variable over time, these variations were not associated to a particular trend, whether increasing or decreasing. Proportions of positive clams for pathogen detection and related quantities of *V. tapetis* were lower in control clams than in clams injected with *V. tapetis* at all sampling times. Altogether, these results show that BRD development in control clams was limited while it was strongly enhanced in *V. tapetis*-injected clams.

4.2. BRD development: *V. tapetis* exposure and algal diet effect

4.2.1. A two-phased dynamics mainly due to *V. tapetis* injection

The effect of *V. tapetis*-injection in clams was characterized by two distinct phases in BRD temporal dynamics in *R. philippinarum* independently from algal diet. A first phase, occurring between 0 and 2 dpi, was characterized by low prevalence (*i.e.* a majority of BRD-), while pathogen burden increased in EF of these animals. These results are supported by the first microscopy observations of BRD development in Manila clam which showed a colonization of periostracal lamina and edge of the mantle by *V. tapetis* from 12 hours until 4 dpi (Paillard and Maes, 1995a, 1995b).

The second phase of disease progress was characterized by (1) the increase in BRD prevalence at 7 dpi (80 %) until a maximal value of 90 % reached at 14 dpi; (2) the 2-fold increase of DSI from 7 to 30 dpi; (3) the increase of SRI at 7 dpi until a full shell repair at 14 dpi and; (4) a decrease of *V. tapetis* load in EF of BRD+ between 14 and 30 dpi. These results are in agreement with Paillard and Maes (1995a, 1995b) which showed an activation of shell repair process concomitantly with conchiolin deposition in *R. philippinarum* three weeks to two months after an experimental infection with *V. tapetis*. Additionally, these studies pointed out that first BRD clinical signs appear at 7 dpi, leading to pathogens encapsulation within the conchiolin matrix. This encapsulation process could then explain the reduced bacterial burden in EF of BRD+.

4.2.2. Clams immune parameters and BRD outcome

Haemocytes functions were not impacted by dietary PUFAs incorporation in clams

Typical PUFAs composition of both *T-Iso* and *C. calcitrans* were mirrored in neutral lipids of clams digestive glands (data not shown), thus confirming their effective incorporation. However, contrary to our initial expectations, haemocytes functions (ROS production, phagocytic rate) as well as THC, haemocytes viability, size and complexity were not affected by algal diet quality. Indeed, previous studies showed that incorporation of

dietary PUFAs could result in major shifts in functional properties of haemocytes and subsequently in immune response in bivalves (Delaporte et al., 2003; Dudognon et al., 2014).

Total haemocytes count (THC), phagocytic rates and ROS production were significantly higher in clams fed *C. calcitrans* compared to T-iso (Delaporte et al., 2003). Contradictory results were observed in haemocytes of the clam *Meretrix meretrix* as THC and phagocytic rates were not influenced by algal diets that were similar to those used in our study (Chen et al., 2015).

In our study and in Delaporte et al. (2003), *R. philippinarum* were collected in the Marennes-Oleron Bay (France) during spring at similar sizes and CI, and were conditioned with the same algal species in similar quantities. Though, we cannot exclude the possibility of different batch origins that could lead to discrepancies in dietary fatty acids incorporation within the same species (Pernet et al., 2008). If such a phenomenon would occur in haemocytes of clams from two distinct batches, then it could explain the substantial differences observed in immune parameters in our study and in Delaporte et al. (2003). Therefore we assume that incorporation of dietary PUFAs was probably not enough discriminant between clams fed T-Iso and *C. calcitrans* to induce significant immune changes.

Haemocytes parameters were not impacted by *V. tapetis* exposition

To our knowledge, this study is the first that examines haemocytes parameters in haemolymph of clams after a peripheral extrapallial injection of *V. tapetis*. Although numerous studies evaluated immune response in haemolymph of clams exposed to *V. tapetis* since 1993, animals were injected either in pallial cavity, adductor muscle or central extrapallial cavity but never in peripheral extrapallial cavity (Allam et al., 2006; Oubella et al., 1993; Paillard, 2004a).

In this study, phagocytic rate, ROS production and THC were not affected by *V. tapetis* injection in peripheral extrapallial cavity of clams over time irrespectively to algal diet quality. Although ROS production inhibition in haemocytes has been observed after *in vitro* exposition haemolymph to *V. tapetis* (Allam et al., 2001; Choquet et al., 2003; Paillard, 2004a; Allam and Ford, 2006), this parameter was never explored after an *in vivo* challenge.

Phagocytic rates of CTC-labelled *V. tapetis* were reduced in extrapallial fluids of clams two hours after injection of CTC-labelled *V. tapetis* in their central extrapallial cavity (Allam et al., 2002). These discrepancies with our results could then be explained by different haemocytes parameters in haemolymph and extrapallial fluids regulations as a function of injection site. In this study, *V. tapetis* injection did neither result in significant changes in THC of clams. Similar results were obtained in haemolymph and extrapallial fluids of clams three hours after injection in central extrapallial cavity (Allam et al., 2006). Our results suggest that further studies should explore haemocytes parameters assessment both in haemolymph of clams and in peripheral extrapallial fluids.

Clams fully recovered from BRD reflecting their relative healthy status

Interestingly, between 14 and 30 dpi, SRI were maximal among all conditions and correspond mainly to the highest stages (2.5 and 3) of Paillard and Maes (1994) classification. This shell repair process was rarely observed to such an extent in frame of experimental infections with *V. tapetis*. Shell repair process results from several factors such as animal condition, amount of conchiolin deposit, bacteria load, environmental conditions as well as BRD host resistance (Plana et al., 1996; Soudant et al., 2004; Trinkler et al., 2010; Paillard et al., 2014).

In our study, clams were collected at the end of spring when field BRD prevalence is lower than in winter (Paillard and Maes, 1994) and in the Marennes-Oléron Bay (Charente Maritime, France) which has been associated to lower prevalence than in populations sampled in Brittany (Soudant et al., 2004). Additionally, food supply during an experimental infection of clams with *V. tapetis* was associated to induction of shell repair process in animals (Plana et al., 1996).

Altogether, the remarkable SRI observed in clams might then reflect their relative good health at 30 dpi, which is likely due to an initial good condition and food supply during the experiment. Also, condition index (CI), usually considered as good indicator of health status in bivalves (Lucas and Beninger, 1985), was similar at arrival, at the end of algal conditioning and at 30 dpi among all conditions. These CI were ca. 70 as in Delaporte et al. (2003) and reflect the good condition of clams as previously reported in Paillard (1992).

Together with shell repair enhancement, these results suggest the relative healthy status of clams. Finally, considering that BRD development in field was generally associated to winter period (Paillard et al., 2004a), i.e., when water temperatures and trophic resources are relatively low, then food supply would allow clams to recover from BRD.

4.3. Host reproductive status influences BRD intensity in clams

BRD is considered as a cold water disease with optimal temperatures for its development around 14°C (Paillard et al., 2004a). Such temperatures are met during spring when clams enter into gametogenesis (Laruelle et al., 1994). Yet, host reproductive status impact on BRD development has never been investigated so far.

Although sex was not a factor influencing BRD development in *V. tapetis*-injected clams, maturity stages greatly affected BRD intensity at 30 dpi. Indeed, the more sexually advanced animals exhibited the highest DSI. Clams at highest maturity stages would then allocate energy into reproduction rather than into immune response, likely leading to higher DSI. This energetic trade-off between immunity and reproduction has already been observed in marine invertebrates such as the abalone, *H. tuberculata* (Travers et al., 2008, 2009) or the oyster *C. gigas* (Ernande et al., 2004; Delaporte et al., 2007; Huvet et al., 2010; Wendling and Wegner, 2013).

However, haemocytes parameters, as well as SRI in *V. tapetis*-injected clams, were not influenced by sexual maturity, which somewhat disagrees with the results of previous studies. Indeed, infection of *H. tuberculata* or *C. gigas* with respectively *Vibrio harveyi* and 10 *Vibrio* strains both led to a general decrease in haemocytes parameters at spawning period (Travers et al., 2008, 2009). Such effects might have been hidden in our study because gametes release did not occur in experimental clams, which was confirmed their similar IC during the experiment. Indeed, clams CI decrease after spawning periods (Laruelle et al., 1994; Laruelle, 1999; Calvez, 2003) and can be associated to lower haemocytes parameters such as THC and viability (Soudant et al., 2004).

Finally, we suppose that combination of *V. tapetis* exposure and sexual maturation was not enough stressful to induce significant changes in haemocytes parameters. A complementary experiment taking into account all maturity stages, including spawning,

would be needed to finely characterize shifts in immunity response, and particularly haemocytes parameters in clams exposed to *V. tapetis*.

5. Conclusion

In summary, brown ring disease (BRD) development was mainly influenced by *V. tapetis* injection but not by algal diet quality and could be split into two main phases (Fig 8): (1) from 0 to 7 dpi, BRD prevalence increased as well as *V. tapetis* burden in extrapallial fluids (EF) of clams and (2) from 7 to 30 dpi, BRD prevalence rose from 80 % to 90 % while *V. tapetis* burden decreased in EF and deposit surface index (DSI) increased as well as shell repair surface (SRI) which reached 100 % between 14 and 30 dpi. Clams haemocytes parameters were similar among all conditions likely reflecting that these conditions were not enough stressful or discriminating to induce any immune change in hemolymph. Also, the noteworthy SRI observed in all clams might suggest their relative good health at the end of experiment and is consistent with similar CI obtained among all conditions. This good condition of experimental clams might be related to an initial good health status and also to food supply during the experiment. Thus food supply would be an interesting way to induce BRD recovery in clams when disease development is not strongly advanced. BRD development was also impacted by host gametogenesis as clams at advanced sexual stages exhibited higher DSI. Therefore, clams were likely facing an energetic trade-off between their reproduction and their immune response towards *V. tapetis*. Further investigations would be needed to characterize the changes associated to this compromise in clams during the whole reproduction process.

Acknowledgements

This work was supported by the "Laboratoire d'Excellence" LabexMER (ANR-10-LABX-19) and co-funded by a grant from the French government under the program "Investissements d'Avenir" and by a grant from the Regional Council of Brittany. This work was also supported by University of Western Brittany. We would first like to thank Fabien Fonteneau (EARL Les Claires de Bonsonge, Marennes, France) for providing the clams. We thank C. Quéré for her help with fatty acid analyses. We thank N. Le Goïc, F. Nunez, H. Hégaret, C. Fabioux, I. Paul-Pont, F. Le Grand, F. Riera, AL. Cassone, P. Le Souchu, A. Muir, E.

Harney, Y. Epelboin, M. Fuhrmann, M. Provost, L. Frère, F. Boullot, B. Dubief, M. Czamanski, R. Morvezen, V. Foulon, M. Protat, for their help for animals injections and samplings. We thank A. Huvet for his help for clams conditioning. We also thank O. Gauthier for advices in statistical analysis and V. Quillien for his help with histological analyses.

References

- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A., Ford, S.E., 2001. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 365–375. doi:10.1016/S0145-305X(00)00072-0
- 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 Shellfish Immunol.* 20, 374–383. doi:10.1016/j.fsi.2005.05.012
- Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., Ford, S.E., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following in vivo challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 384–397. doi:10.1016/j.fsi.2005.05.013
- Allam, B., Paillard, C., Ford, S.E., 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis. Aquat. Organ.* 48, 221–231. doi:10.3354/dao048221
- Andres Aranda-Burgos, J., da Costa, F., Novoa, S., Ojea, J., Martinez-Patino, D., 2014. Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* larvae. *Aquaculture* 420, 38–48. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.10.032
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2013. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R Package Version 1.
- Bidault, A., Richard, G., Le Bris, C., Paillard, C., n.d. Development of a Taqman real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio tapetis* in extrapallial fluids of clams.
- Bricelj, V.M., Ford, S.E., Lambert, C., Barbou, A., Paillard, C., 2011. Effects of toxic *Alexandrium tamarense* on behavior, hemocyte responses and development of brown ring disease in Manila clams. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 430, 35–48. doi:10.3354/meps09111
- Caers, M., Coutteau, P., Sorgeloos, P., 1999. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture* 170, 307–322. doi:10.1016/S0044-8486(98)00410-4
- Calvez, I., 2003. Approche de la variabilité d'une population de palourdes *Ruditapes Philippinarum* (Adams et Reeve), aux stades larvaires et post-larvaires. Université de Bretagne occidentale, France.
- Chen, S.-M., Tseng, K.-Y., Huang, C.-H., 2015. Fatty acid composition, sarcoplasmic reticular lipid oxidation, and immunity of hard clam (*Meretrix lusoria*) fed different dietary microalgae. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 141–145. doi:10.1016/j.fsi.2015.02.025
- 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. doi:10.3354/dao057109

- Da Costa, F., Novoa, S., Ojea, J., Martinez-Patino, D., 2012. Effects of algal diets and starvation on growth, survival and fatty acid composition of *Solen marginatus* (Bivalvia: Solenidae) larvae. *Sci. Mar.* 76, 527–537. doi:10.3989/scimar.03470.18A
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Jegaden, M., Moal, J., Pouvreau, S., Degremont, L., Boudry, P., Samain, J.-F., 2007. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 353, 45–57. doi:10.1016/j.jembe.2007.09.003
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Segueineau, C., Samain, J.-F., 2006. Impact of 20 : 4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* 41, 567–576. doi:10.1007/s11745-006-5006-9
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Kraffe, E., Marty, Y., Samain, J.F., 2005. Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comp. Biochem. Physiol. -Mol. Integr. Physiol.* 140, 460–470. doi:10.1016/j.cbpb.2005.02.009
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quere, 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*. *J. Exp. Biol.* 206, 3053–3064. doi:10.1242/jeb.00518
- Development Core Team, R., 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing.
- 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. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.01.052
- Dudognon, T., Lambert, C., Quere, C., Auffret, M., Soudant, P., Kraffe, E., 2014. Mitochondrial activity, hemocyte parameters and lipid composition modulation by dietary conditioning in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Comp. Physiol. B-Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 184, 303–317. doi:10.1007/s00360-013-0800-1
- Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J., Haure, J., 2004. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *J. Evol. Biol.* 17, 342–356. doi:10.1046/j.1420-9101.2003.00674.x
- Flye-Sainte-Marie, J., Jean, F., Ford, S.E., Paillard, C., 2008. Effect of sediment grain-size on development of brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 278, 184–187. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.03.013
- Flye-Sainte-Marie, J., Pouvreau, S., Paillard, C., Jean, F., 2007. Impact of Brown Ring Disease on the energy budget of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 349, 378–389. doi:10.1016/j.jembe.2007.05.029
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goic, N., Moal, J., Suquet, M., Gueguen, M., Sunila, I., Soudant, P., 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* 9, 427–439. doi:10.1016/j.hal.2010.01.003
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves: a practical manual. Food and agriculture organization of the United Nations.
- Howard, D.W., Smith, C.S., Center, N.F., 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks.

- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., Boudry, P., 2010. Reproductive effort of Pacific oysters: A trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture* 304, 95–99. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.03.022
- Laruelle, F., 1999. Phénologie et déterminisme de la reproduction chez *Ruditapes decussatus* (L.) et *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve) en Bretagne. Université de Bretagne occidentale, France.
- Laruelle, F., Guillou, J., Paulet, Y., 1994. Reproductive Pattern of the Clams, *Ruditapes-Decussatus* and *R-Philippinarum* on Intertidal Flats in Brittany. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 74, 351–366.
- Le Bris, C., Richard, G., Paillard, C., Lambert, C., Seguineau, C., Gauthier, O., Pernet, F., Guerard, F., 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* - Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 16–24. doi:10.1016/j.fsi.2014.10.021
- Lucas, A., Beninger, P., 1985. The Use of Physiological Condition Indexes in Marine Bivalve Aquaculture. *Aquaculture* 44, 187–200. doi:10.1016/0044-8486(85)90243-1
- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J., Samain, J., 1992. Changes in the Fatty-Acid Composition of *Pecten-Maximus* (l) During Larval Development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 221–234. doi:10.1016/0022-0981(92)90051-B
- Oubella, R., Maes, P., Paillard, C., Auffret, M., 1993. Experimentally-Induced Variation in Hemocyte Density for *Ruditapes-Philippinarum* and *R-Decussatus* (mollusca, Bivalvia). *Dis. Aquat. Organ.* 15, 193–197. doi:10.3354/dao015193
- Paillard, C., 2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Living Resour.* 17, 467–475. doi:10.1051/alr:2004053
- Paillard, C., 1992. Etiologie et caractérisation de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'élevage *Ruditapes philippinarum* (PhD thesis). Université de Bretagne occidentale, France.
- Paillard, C., Allam, B., Oubella, R., 2004a. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Organ.* 59, 249–262. doi:10.3354/dao059249
- Paillard, C., Jean, F., Ford, S.E., Powell, E.N., Klinck, J.M., Hofmann, E.E., Flye-Sainte-Marie, J., 2014. A theoretical individual-based model of Brown Ring Disease in Manila clams, *Venerupis philippinarum*. *J. Sea Res.* 91, 15–34. doi:10.1016/j.seares.2014.03.005
- Paillard, C., Le Roux, F., Borrego, J.J., 2004b. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* 17, 477–498. doi:10.1051/alr:2004054
- Paillard, C., Maes, P., 1995a. The Brown Ring Disease in the Manila Clam, *Ruditapes-Philippinarum* .1. Ultrastructural Alterations of the Periostrecal Lamina. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 91–100. doi:10.1006/jipa.1995.1015
- Paillard, C., Maes, P., 1995b. The Brown Ring Disease in the Manila Clam, *Ruditapes-Philippinarum* .2. Microscopic Study of the Brown Ring Syndrome. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 101–110. doi:10.1006/jipa.1995.1016
- Paillard, C., Maes, P., 1994. Brown Ring Disease in the Manila Clam *Ruditapes-Philippinarum* - Establishment of a Classification-System. *Dis. Aquat. Organ.* 19, 137–146. doi:10.3354/dao019137

- Paillard, C., Maes, P., 1990. Etiology of the Brown Ring Disease in Tapes-Philippinarum - Pathogenicity of a *Vibrio* Sp. *Comptes Rendus Acad. Sci. Ser. Iii-Sci. Vie-Life Sci.* 310, 15–20.
- Paillard, C., Maes, P., Oubella, R., 1994. Brown ring disease in clams. *Annu. Rev. Fish Dis.* 4, 219–240.
- Paul-Pont, I., de Montaudouin, X., Gonzalez, P., Jude, F., Raymond, N., Paillard, C., Baudrimont, M., 2010. Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the introduced marine bivalve *Ruditapes philippinarum* in European populations. *Environ. Pollut.* 158, 3401–3410. doi:10.1016/j.envpol.2010.07.028
- Pernet, F., Tremblay, R., Langdon, C., Bourget, E., 2004. Effect of additions of dietary triacylglycerol microspheres on growth, survival, and settlement of mussel (*Mytilus* sp.) larvae. *Mar. Biol.* 144, 693–703. doi:10.1007/s00227-003-1234-1
- Pernet, F., Tremblay, R., Redjah, I., Sevigny, J.-M., Gionet, C., 2008. Physiological and biochemical traits correlate with differences in growth rate and temperature adaptation among groups of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Exp. Biol.* 211, 969–977. doi:10.1242/jeb.014639
- Plana, S., Le Penneec, M., 1991. Alterations in the digestive diverticula and nutritional consequences in the clam *Ruditapes philippinarum* infected by a *Vibrio*. *Aquat. Living Resour.* 4, 255–264. doi:10.1051/alr:1991027
- Plana, S., Siquin, G., Maes, P., Paillard, C., LePenneec, M., 1996. Variations in biochemical composition of juvenile *Ruditapes philippinarum* infected by a *Vibrio* sp. *Dis. Aquat. Organ.* 24, 205–213. doi:10.3354/dao024205
- Raftos, D.A., Kuchel, R., Aladaileh, S., Butt, D., 2014. Infectious microbial diseases and host defense responses in Sydney rock oysters. *Front. Microbiol.* 5, 135. doi:10.3389/fmicb.2014.00135
- 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. Organ.* 56, 249–258. doi:10.3354/dao056249
- Richard, G., Le Bris, C., Guerard, F., Lambert, C., Paillard, C., 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* - Part II: Combined effect of temperature and two *V-tapetis* strains. *Fish Shellfish Immunol.* 44, 79–87. doi:10.1016/j.fsi.2014.12.039
- Sauvage, C., Pepin, J.F., Lapegue, S., Boudry, P., Renault, T., 2009. Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: Differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Res.* 142, 181–187. doi:10.1016/j.virusres.2009.02.013
- Shaw, B.L., Battle, H.I., 1957. The Gross and Microscopic Anatomy of the Digestive Tract of the Oyster *Crassostrea Virginica* (gmelin). *Can. J. Zool.* 35, 325–347. doi:10.1139/z57-026
- Soudant, P., Chu, F.-L.E., Volety, A., 2013. Host-parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. *J. Invertebr. Pathol.* 114, 196–216. doi:10.1016/j.jip.2013.06.001
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Robert, R., Quere, C., LeCoz, J.R., Samain, J.F., 1996. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture* 143, 361–378. doi:10.1016/0044-8486(96)01276-8

- 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. doi:10.1016/S0044-8486(03)00352-1
- Tompkins, J., Culture Collection of Algae and Protozoa, Natural Environment Research Council (Great Britain), 1995. Catalogue of strains, 1995. Culture Collection of Algae and Protozoa, Ambleside, Cumbria, U.K.
- Travers, M.-A., Basuyaux, O., Le Goic, N., Huchette, S., Nicolas, J.-L., Koken, M., Paillard, C., 2009. Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Glob. Change Biol.* 15, 1365–1376. doi:10.1111/j.1365-2486.2008.01764.x
- 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 Shellfish Immunol.* 25, 800–808. doi:10.1016/j.fsi.2008.08.003
- 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. *J. Invertebr. Pathol.* 104, 8–16. doi:10.1016/j.jip.2009.12.007
- Venables, W.N., Ripley, B.D., 2013. *Modern applied statistics with S-PLUS*. Springer Science & Business Media.
- Walne, P.R., 1976. Experiments on the culture in the sea of the butterfish *Venerupis decussata* L. *Aquaculture* 8, 371–381. doi:10.1016/0044-8486(76)90119-8
- Wendling, C.C., Wegner, K.M., 2013. Relative contribution of reproductive investment, thermal stress and *Vibrio* infection to summer mortality phenomena in Pacific oysters. *Aquaculture* 412, 88–96. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.07.009
- Wickham, H., Chang, W., 2015. *ggplot2: An Implementation of the Grammar of Graphics*.

Table 1: Haemocytes parameters, DSI & SRI (means, standard deviations or SD, n) in *R. philippinarum* not injected (0), injected with filtered seawater (FSW) or with *V. tapetis* (*V.t.*) as a function of time (0, 2, 7, 14 & 30 days post-injection or dpi). Values in bold refer to significant effects of injection condition (phagocytosis and ROS production), time and injection condition (DSI) or time (SRI).

Time (dpi)		0				2			7			14			30		
Injection condition		0	0	FSW	<i>V.t.</i>	0	FSW	<i>V.t.</i>	0	FSW	<i>V.t.</i>	0	FSW	<i>V.t.</i>			
Phagocytosis (%)	Mean	35,00	34,00	43,00	40,00	39,00	47,00	43,00	36,00	41,00	42,00	38,00	38,00	41,00			
	SD	10,50	11,40	12,00	12,00	9,70	12,10	13,80	12,40	11,70	9,70	12,40	13,20	8,60			
	n	128	51	39	47	42	42	38	42	47	44	47	36	42			
ROS (A.U.)	Mean	157,00	195,00	201,00	192,00	132,00	172,00	172,00	-	-	-	-	-	-			
	SD	57,00	57,00	62,00	63,00	46,00	98,00	59,00	-	-	-	-	-	-			
	n	130	51	41	47	41	44	36	-	-	-	-	-	-			
Size (A.U.)	Mean	343,00	359,00	358,00	348,00	364,00	368,00	365,00	316,00	312,00	307,00	-	-	-			
	SD	18,00	20,00	19,00	27,00	25,00	24,00	23,00	52,00	55,00	64,00	-	-	-			
	n	132	53	41	52	42	47	39	46	50	49	-	-	-			
Complexity (A.U.)	Mean	109,00	96,00	99,00	100,00	110,00	115,00	111,00	91,00	89,00	86,00	-	-	-			
	SD	11,40	11,20	7,70	10,30	12,10	13,50	13,40	16,30	16,60	20,70	-	-	-			
	n	132	53	41	52	42	47	39	46	50	49	-	-	-			
Viability (%)	Mean	99,00	99,00	99,00	97,00	99,00	99,00	99,00	99,00	98,00	98,00	98,00	97,00	99,00			
	SD	1,18	1,37	1,87	11,33	0,93	2,01	1,41	0,66	1,43	1,03	1,52	2,66	1,01			
	n	132	53	41	52	42	47	39	46	50	49	44	30	39			
THC (10 ⁶ cells/mL)	Mean	0,48	0,47	0,42	0,55	0,50	0,50	0,62	0,74	0,63	0,76	-	-	-			
	SD	0,38	0,42	0,31	0,64	0,37	0,39	0,89	0,65	0,53	0,65	-	-	-			
	n	132	53	41	52	42	47	39	46	50	49	-	-	-			
DSI (%)	Mean	1,50	2,41	3,00	2,34	1,28	3,80	1,71	0,56	3,27	2,57	3,52	3,06	3,12			
	SD	1,40	1,60	2,70	1,80	0,70	7,70	1,60	0,30	2,70	2,50	4,30	3,60	3,50			
	n	18	5	6	5	4	14	48	5	15	53	16	18	54			
SRI (%)	Mean	69,00	77,00	88,00	67,00	48,00	81,00	57,00	100,00	95,00	86,00	100,00	100,00	97,00			
	SD	37,38	32,84	15,21	47,02	40,94	30,81	40,39	0,00	16,01	21,97	0,00	0,04	8,78			
	n	18	5	6	5	4	14	48	5	15	53	16	19	54			

Table 2: Mean condition indexes of clams at arrival (Initial), after algal-conditioning and at the end of experiment (30 dpi). Values are means \pm standard deviations; (FSW = filtered sweater, dpi = days post-injection).

Initial	After algal-conditioning		At 30 dpi					
	T-iso	C. calcitrans	T-iso			C. calcitrans		
			Not injected	FSW	V. tapetis	Not injected	FSW	V. tapetis
84.35 \pm 19.07 (n = 50)	73.59 \pm 10.04 (n = 53)	73.60 \pm 11.04 (n = 51)	70.04 \pm 9.20 (n = 66)	65.18 \pm 9.59 (n = 30)	68.66 \pm 9.71 (n = 30)	69.21 \pm 9.18 (n = 60)	70.34 \pm 10.81 (n = 30)	66.5 \pm 9.75 (n = 30)

Legends of Figures:

Fig 1: Schematic view summarizing experimental design – Abbreviations: FSW = filtered sterile seawater; dpi = days post-injection; UFC = units forming colony

Fig 2: Photographs of A. BRD- clam and B. BRD+ clam where white, red and yellow lines respectively encircle S_{WS} , S_{BRD} and S_{SR} .

Fig 3: A – D: Gonad development stages for male *Ruditapes philippinarum*. A. Stage 1: Early developing. B. Stage 2: Late developing. C. Stage 3: Ripe. D.: Spawning/Partially spent. Abbreviations: FW, follicle wall; SC, spermatocyte; SD, spermatid; SN, spermatogonia; SZ, spermatozoa. E – G: Gonad development stages for female *Ruditapes philippinarum*. E. Stage 1: Early developing. F. Stage 2: Late developing. G. Stage 3: Ripe. Abbreviations: DO, developing oocyte; FW, follicle wall; MO, mature oocyte. Scale bar on each Fig.

Fig 4: Predicted probabilities from GLMM modeling BRD prevalence as a function of time (dpi = days post-injection) and injection (No injection – light grey, filtered sterile seawater or FSW – medium grey and *V. tapetis* – dark grey). Letters indicate significant differences in prevalence upon time and injection between groups (GLMM followed by post-hoc LS-means). Ribbons represent GLMM maximal and minimal predicted values at each point. N = 60 individuals per time and injection combination.

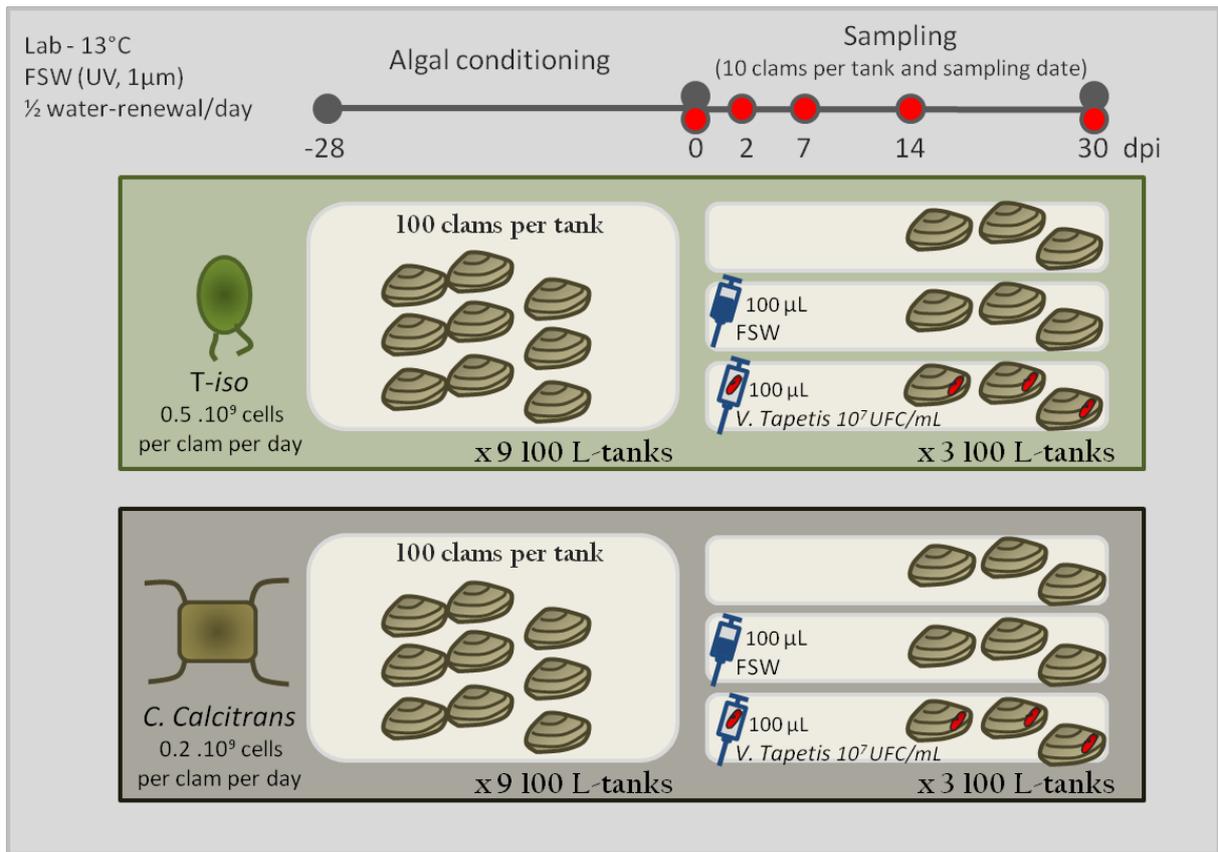
Fig 5: Temporal variations of mean *V. tapetis* burden in EF of in not injected, FSW- and *V. tapetis*-injected clams. White circles represent BRD- and black circles BRD+. Error bars represent upper standard deviation. Fractions indicate the number of clams positive for *V. tapetis* detection compared to the total of analyzed clams. The solid line represents the detection threshold for *V. tapetis*. N= 12 clams per sampling time and per injection condition.

Fig 6: Sex and sexual maturity stages proportions in clams as percentages (n = 30 per injection condition per algal diet and per day) as a function of time, injection condition and algal diet. Abbreviations: U, undifferentiated; M-1, M-2, M-3 and M-4, males at stage 1, 2, 3 and 4; H, hermaphrodite; F-1, F-2, F-3 and F-4, females at stage 1, 2, 3 and 4; dpi, days post-injection.

Fig 7: A. Deposit Surface Index (%) and B. Surface Repaired Index (%) in BRD+ *V. tapetis*-injected clams 30 dpi as a function of sexual maturity. Letters indicate significant differences in DSI and SRI between groups (LMM followed by post-hoc LS-means). Error bars represent standard errors.

Fig 8: Schematic view of Brown Ring Disease (BRD) development following an experimental injection of *V. tapetis* in peripheral extrapallial cavity of *R. philippinarum* in relation with algal diet and host reproductive status– Abbreviations: EF, Extrapallial Fluids; dpi, days post-injection.

Fig 1



Analyses related to algal conditioning and sampling periods

- BRD diagnosis, histology, flow cytometry, *V. tapetis* detection and quantification
- BRD diagnosis, Condition Index (CI)

Fig 2

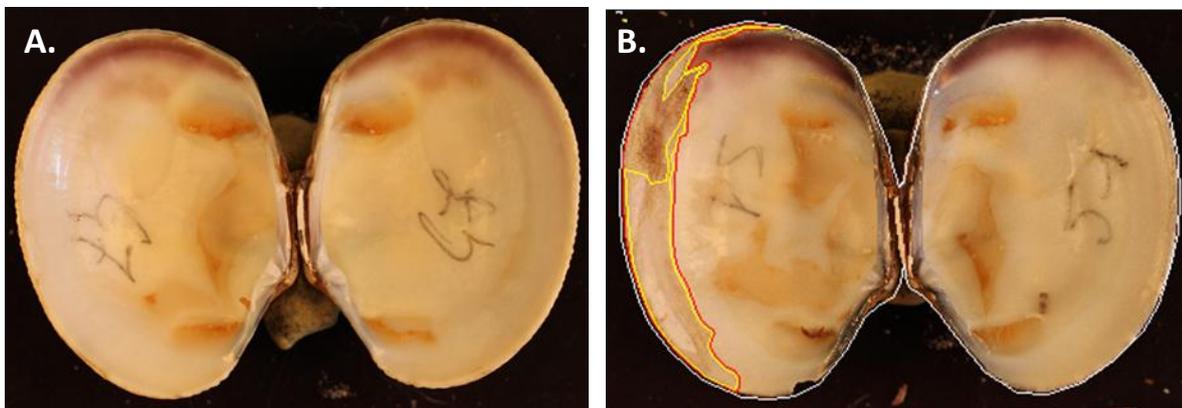


Fig 3

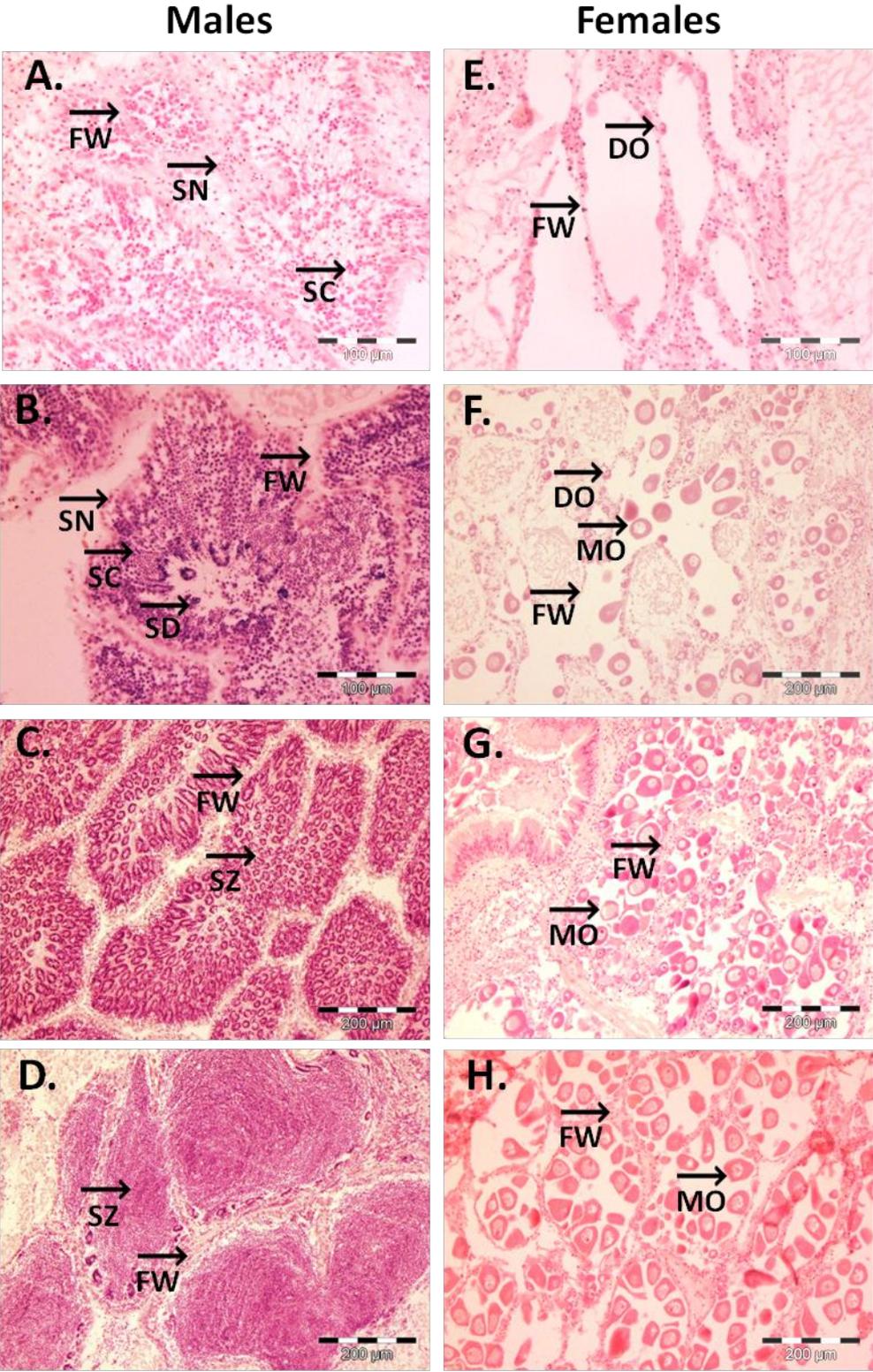


Fig 4

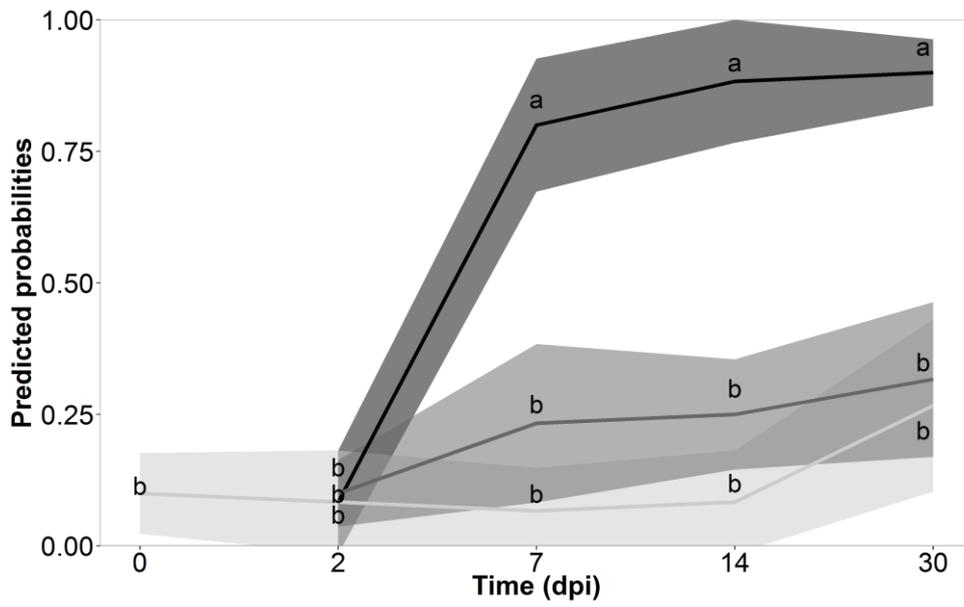


Fig 5

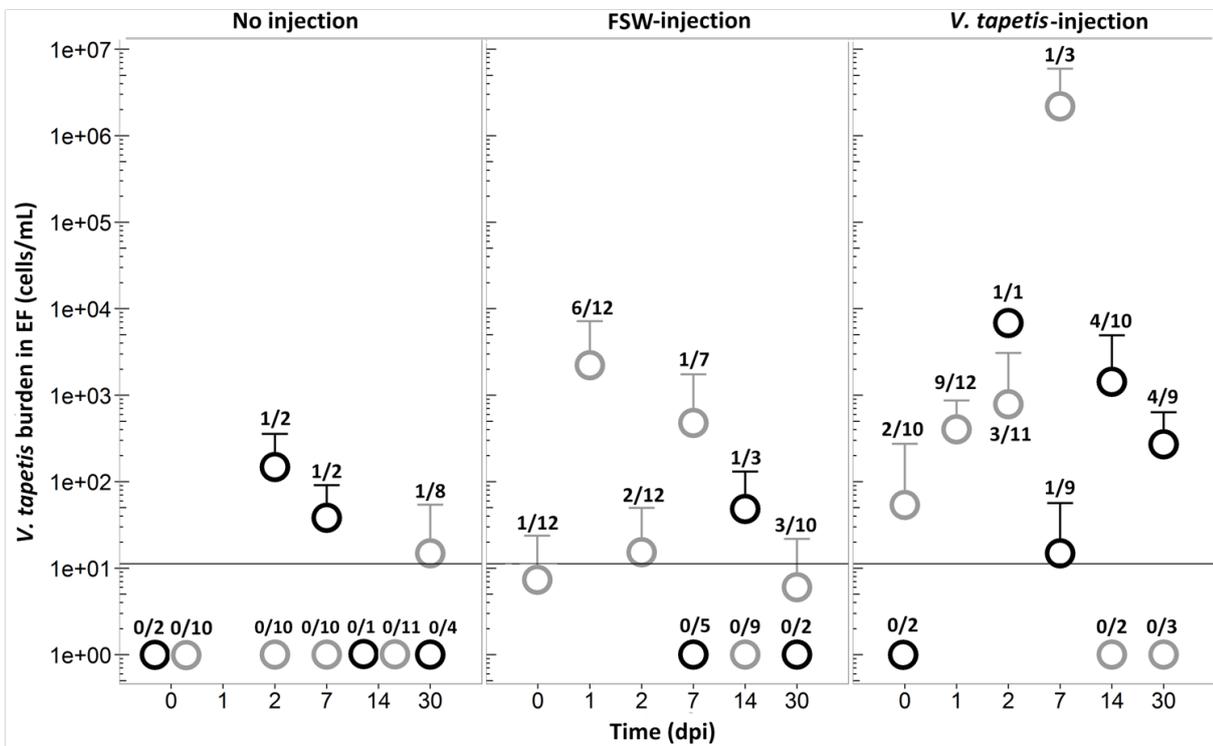


Fig 6

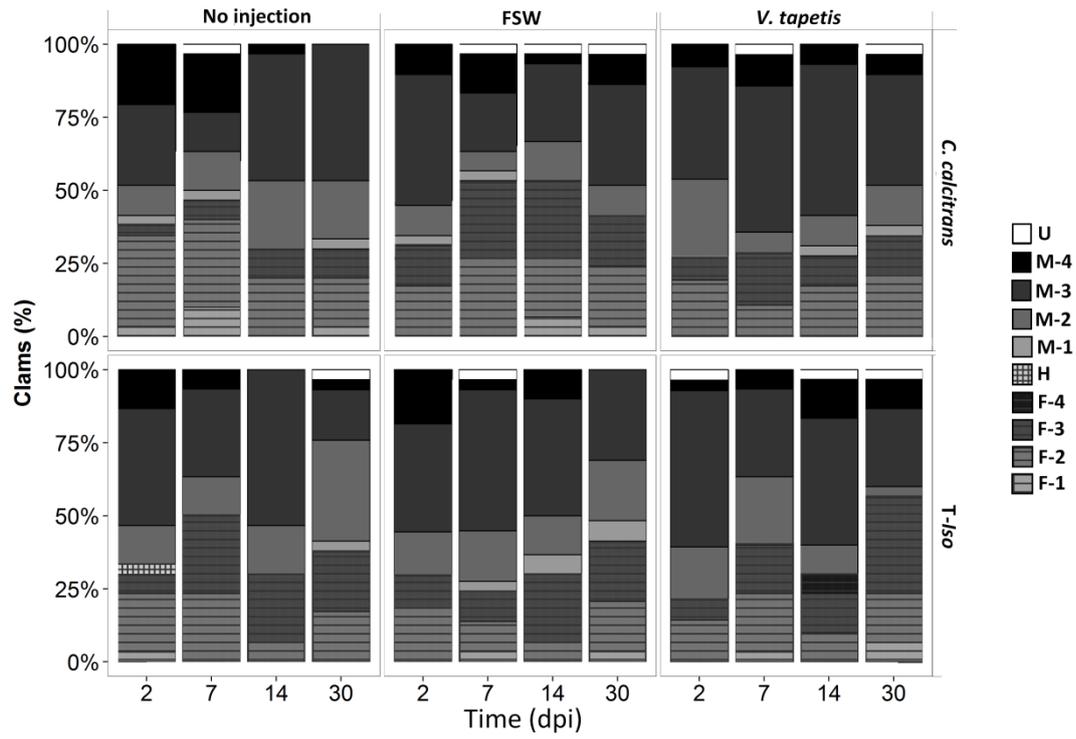


Fig 7

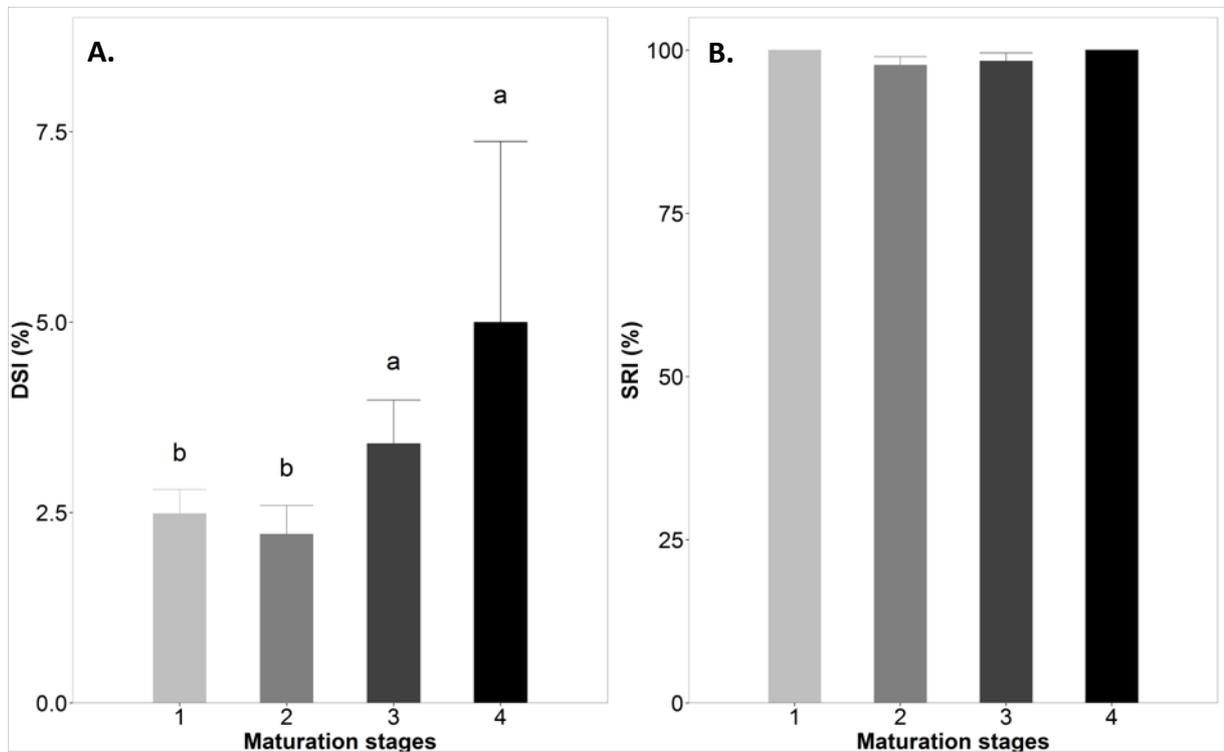
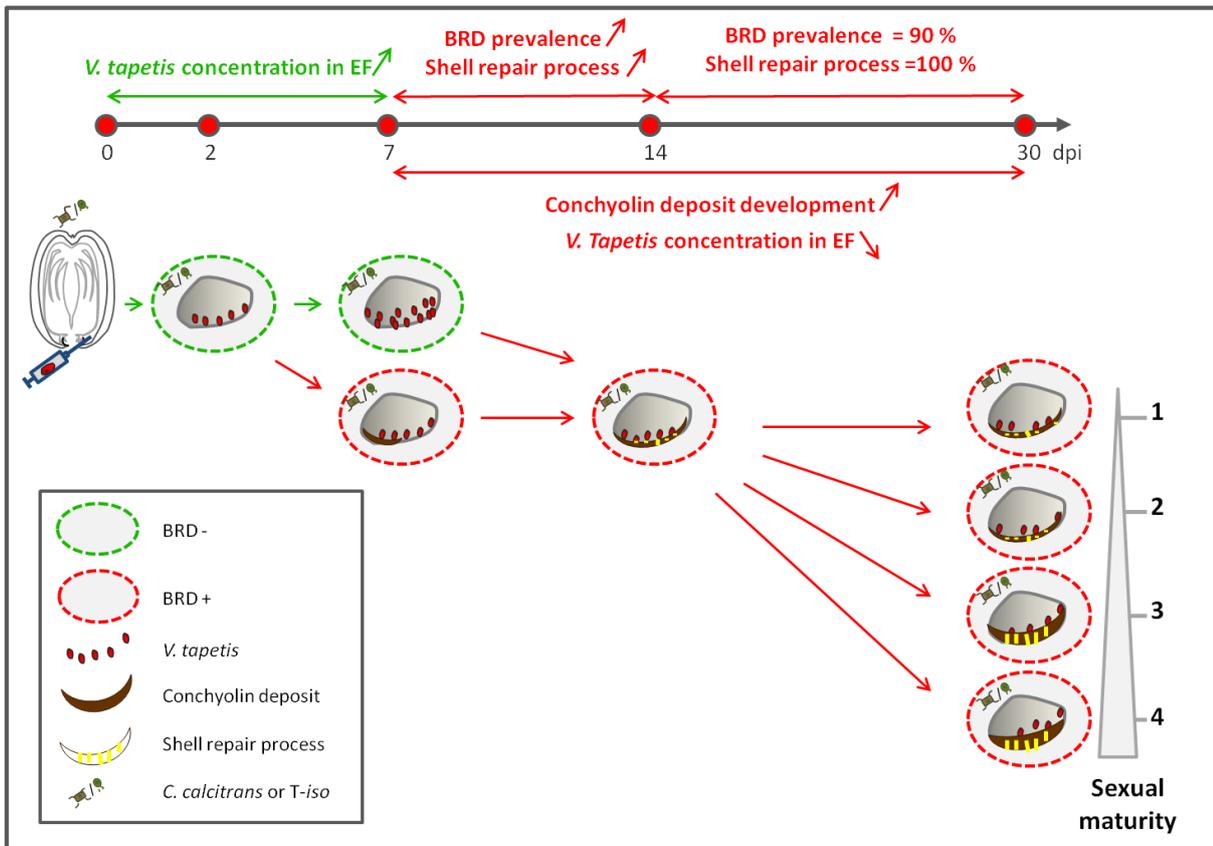


Fig 8



3. Conclusions de l'expérimentation 2 – étude individuelle

La composition en acides gras polaires insaturés (AGPI) des lipides neutres des glandes digestives des palourdes reflétait bien les signatures typiques en AGPI des deux algues utilisées à savoir, *T-Isochrysis aff. galbana*, clone Tahitian (*T-Iso*) et *Chaetoceros calcitrans*. Ce résultat indique que le conditionnement des animaux aux deux algues pendant 4 semaines a bien été effectif.

Les résultats de l'expérimentation 2 ont montré que la prévalence et l'intensité de la MAB n'étaient pas influencées par la qualité de la microalgue de fourrage mais uniquement par l'injection de *V. tapetis*. De plus, le développement de la MAB chez les individus injectés avec *V. tapetis* a été caractérisé par deux phases :

- De 0 à 2 jours post-injection : la prévalence de la maladie est faible alors que la charge en *V. tapetis* dans les fluides extrapalléaux augmente chez ces animaux.
- De 7 à 30 jours post-injection : la prévalence et l'intensité de la maladie augmentent et le processus de réparation coquillère est fortement activé alors que la charge en *V. tapetis* diminue dans les fluides extrapalléaux.

Ni la qualité des microalgues, ni l'injection de *V. tapetis* n'ont eu d'impact sur les variables hématocytaires des palourdes. Concernant les microalgues, cela pourrait s'expliquer par une incorporation des AGPI qui n'aurait peut-être pas suffisamment reflété les déficiences en AGPI des deux régimes monoalgaux, n'induisant donc pas de différences au niveau des paramètres hématocytaires. Plus généralement, les paramètres hématocytaires sont particulièrement affectés par les variations de l'environnement et peuvent ainsi refléter l'interaction de différents facteurs environnementaux en même temps. Cependant, on peut supposer que si le facteur testé n'est pas « suffisamment stressant », alors une éventuelle tendance évolutive de ces paramètres pourrait être masquée par l'importance des variations inter-individuelles.

Les régimes monoalgaux et l'injection par *V. tapetis* n'ont pas eu d'impact sur le processus de réparation coquillère et les indices de condition (IC). Cependant, les taux de réparation coquillères et les IC étaient particulièrement élevés et nous avons observé un état de guérison chez les animaux injectés par *V. tapetis* à 30 jours post-injection.

Finalement, ces résultats semblent indiquer que les animaux étaient en bonne santé à leur arrivée et le maintien de cet état de santé durant l'expérimentation serait probablement dû à un apport de nourriture en quantité suffisante.

Le résultat majeur de cette étude réside dans l'impact du stade de maturité sexuelle de l'hôte sur le développement de la MAB. **En effet, les animaux les plus matures sexuellement ont également été ceux qui présentaient de plus fortes intensités de la maladie.** Cet effet semblerait indiquer qu'un compromis énergétique entre réponse immunitaire et gamétogénèse s'opère chez les palourdes injectées avec *V. tapetis*. **Cependant, le stade de maturité sexuelle n'a pas eu de répercussion sur les paramètres hématocytaires et la réparation coquillère.** Ici, nous pouvons penser que le bon état de santé initial des animaux et l'apport de nourriture en quantité suffisante auront fourni aux palourdes injectées avec *V. tapetis* l'énergie nécessaire pour lutter contre le pathogène.

3^{ème} partie

**Réponses métaboliques de *Ruditapes philippinarum* exposée à *Vibrio tapetis*
en relation avec le régime algal**

1. Introduction

Lors des premières observations de mortalité associées à la maladie de l'anneau brun (MAB) à Landéda, une constatation a été faite sur les animaux remontants à la surface du sédiment : leurs indices de condition et leur croissance étaient particulièrement bas (Gouletquer et al., 1989; Paillard, 1992). Par ailleurs, Plana et al. (1996) ont également mis en évidence une chute significative des réserves en glycogène chez les animaux présentant des signes cliniques de la MAB. Ces auteurs ont suggéré que les mortalités massives de palourdes observées à la fin des années 1980 pourraient être dues à l'altération de l'activité du métabolisme énergétique des animaux atteints de la MAB. **Fort de ces constats, nous avons voulu étudier la réponse associée au métabolisme énergétique de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis* en fonction du régime algal. Plus particulièrement, nous avons évalué d'une part, les réserves énergétiques de l'animal et, d'autre part, l'activité d'enzymes impliquées dans la glycolyse, l'hexokinase (HK) et la pyruvate kinase (PK) ainsi qu'une enzyme du cycle de Krebs, la citrate synthase (CS).**

Afin de lutter contre *V. tapetis*, nous avons vu dans la première partie de ce manuscrit que la palourde japonaise était capable de mettre en place une réponse immunitaire consistant en l'activation des activités phénoloxidase (PO) et superoxyde dismutase (SOD). Par ailleurs, l'implication d'autres enzymes antioxydantes dans la réponse de *R. philippinarum* à *V. tapetis* a été suggérée par de nombreuses études d'expression de gènes. En effet, l'expression des gènes codant pour SOD, la glutathion-S-transférase (GST), la thiorédoxine (Trx) est augmentée dans les deux jours suivant une exposition de *R. philippinarum* à *V. tapetis* (Revathy et al., 2012a, 2012b; Umasuthan et al., 2012a, 2012b, 2012c; Bathige et al., 2014).

Ainsi, un second objectif de notre étude était de caractériser la réponse antioxydante de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis* en association avec le régime algal et cela en utilisant les protocoles de mesures d'activités antioxydantes adaptés au cours de cette thèse pour la palourde japonaise. Ainsi, les activités SOD totale, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, catalase (CAT), glutathion peroxidase selenium dépendante (Se-GPx) et non selenium dépendante (Non Se-GPx), glutathion réductase (GR), GST, thiorédoxine réductase (TrxR)

ont été mesurées dans le but de mieux comprendre les mécanismes de ce système dans la réponse antioxydante de *R. philippinarum*.

En parallèle à cette réponse antioxydante visant à détoxifier les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites afin de lutter contre l'agent pathogène, d'autres espèces réactives peuvent être impliquées: il s'agit des espèces réactives de l'azote (ERA) (Hausladen & Stamler, 1999; Donaghy et al., 2015). A l'origine de ces ERA, le monoxyde d'azote (NO) produit par l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) est impliqué dans la réponse immunitaire innée chez les invertébrés. L'étude menée par Jeffroy & Paillard (2011) a montré que des nitrites (NO_2^-), issus de la dégradation du NO, étaient produits dans l'hémolymphe et dans les fluides extrapalléaux de *R. philippinarum* suite à une exposition *in vitro* à *V. tapetis*. Par ailleurs, l'utilisation d'un inhibiteur de la iNOS dans l'étude de Jeffroy & Paillard (2011) a permis d'associer cette production de NO_2^- à l'activité de cette enzyme. Cependant, l'activité iNOS *stricto sensu* n'a, à notre connaissance, jamais été étudiée chez les bivalves lors d'une exposition *in vivo* à un agent pathogène. **Ainsi, le troisième objectif des travaux de cette thèse visait à évaluer la réponse d'activités enzymatiques liées à l'immunité innée, l'activité iNOS et l'activité PO, suite à l'exposition de *R. philippinarum* à *V. tapetis*.**

Cette étude (expérimentation 2 – étude par pools) fait suite à celle présentée dans la seconde partie de ce manuscrit visant à évaluer l'effet de la qualité de la ressource trophique et du statut de reproduction de la palourde sur le développement de la MAB. Afin de mesurer toutes les activités enzymatiques citées ci-dessus, nous avons décidé d'effectuer cette étude en utilisant des pools d'animaux, comme décrit dans l'article 3.

2. Article 3

“Metabolic responses of clam *Ruditapes philippinarum* exposed to its pathogen *Vibrio tapetis* in relation to diet” – soumis à *Developmental and Comparative Immunology* en Novembre 2015.

Metabolic responses of clam *Ruditapes philippinarum* exposed to its pathogen *Vibrio tapetis* in relation to diet

Gaëlle Richard^{1*}, Fabienne Guérard¹, Charlotte Corporeau², Christophe Lambert¹, Christine Paillard¹, Fabrice Pernet²

¹ : UMR 6539 CNRS UBO IRD IFREMER, LEMAR – IUEM – UBO, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest-Iroise – Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France.

² : Ifremer, UMR 6539 LEMAR (CNRS/UBO/IRD/Ifremer), Technopôle Brest-Iroise CS 10070, 29280 Plouzané, France.

* Corresponding author

E-mail: gaelle.richard@univ-brest.fr

Abstract

Since the late 1980s, the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, has been affected by Brown Ring Disease (BRD) due to the pathogenic bacterium *Vibrio tapetis*. Here we investigated the effect of disease development and algal diet during a *V. tapetis* exposure on energy reserves and activity of enzymes related to energy metabolism, antioxidant system and immunity. Mantle of clams was individually sampled and pooled for the biochemical analysis according to diet, injection, tank replicate and BRD status at each time post-injection. We found that algal diet did not impact the metabolic response of clams exposed to *V. tapetis*, likely reflecting that dietary deficiencies in essential fatty acids were compensated. At two days post-injection (dpi), a defense response consisting in decreased activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase (GPx) and increased activities of nitric oxide synthase (iNOS) and catalase was observed in *V. tapetis* injected clams, although no clinical signs were visible (BRD-). At 7 dpi, activities of several antioxidant and immune-related enzymes were markedly increased in BRD- likely indicating an efficient ROS scavenging compared to animals which developed clinical signs of BRD (BRD+). Therefore, resistance to BRD clinical signs appearance was associated to higher detoxication of ROS and

enhancement of immune response. This study provides new biochemical indicators of disease resistance and a more comprehensive view of the global antioxidant response of clam to BRD development.

Keywords

Antioxidant enzymes, immunity, energetic metabolism, *Ruditapes philippinarum*, *Vibrio tapetis*.

1. Introduction

The bacteria *Vibrio tapetis* is the causative agent of Brown Ring Disease (BRD) which affects the Manila clam *Ruditapes philippinarum* worldwide since the late 80's (Paillard and Maes, 1994). The main clinical signs of BRD are a brown organic deposit called conchiolin on the inner shell of the clam. In fact, this defense response of the mantle is called "nacrezation" and consists of conchiolin deposit enclose the pathogen followed by deposition of new calcified layers which may lead to shell repair (Paillard and Maes, 1995a; Trinkler et al., 2010). When these defense responses are not sufficient, lesions occur and the pathogen invades the host leading to septicaemia and death (Allam et al., 2002)

Bacterial exposure can induce important alterations in energy reserves of bivalves and consequently on its metabolism. For instance, clams infected with *V. tapetis* exhibit glycogen reserves depletion, weight loss and lower condition indexes (Gouilletquer, 1989; Plana, 1995; Plana et al., 1996). Also, energetic status of the host plays a major role in the outcome (death or recovery) of a bacterial infection in bivalves (Paillard, 2004a; Flye-Sainte-Marie et al., 2007; Genard et al., 2013). For instance, oyster *C. virginica* larvae exposed to *Vibrio corallilyticus* show a marked decline in food intake which coincided with lower triglyceride and protein content, the two main energetic reserves in bivalve larvae (Genard et al., 2013).

Invertebrate immune system is non-adaptive or innate and incorporates cellular and humoral components (Ellis et al., 2011). The main cellular defense mechanism relies on phagocytosis by the immunocompetent cells that are the haemocytes and is separated in several steps including recognition, chemotaxis, attachment, incorporation and destruction

through the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (Pipe and Coles, 1995; F. L. E. Chu, 2000; Soudant et al., 2013; Donaghy et al., 2015).

The internal destruction of pathogenic agents in bivalves relies on higher production of ROS and RNS that are toxic to invaders (Donaghy et al., 2015). Accumulation of ROS and RNS can result in oxidative stress in the host (Lesser, 2006) which is normally prevented by antioxidant enzymes (Sies, 1993; Hermes-Lima, 2004). Superoxide dismutase (SOD) transforms superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) into hydrogen peroxide (H_2O_2) (Manduzio et al., 2005). Then, H_2O_2 is decomposed into H_2O and O_2 by catalase (CAT) or by glutathione peroxidases (GPx) and thioredoxin peroxidase (TrxP) when H_2O_2 and organic peroxides concentration are low (Hermes-Lima, 2004; Manduzio et al., 2005). Activities of GPx and TrxP depend on oxidation states of glutathione and thioredoxin (Trx) respectively, which are controlled by glutathione reductase (GR) and thioredoxin reductase (TrxR) (Powis and Montfort, 2001). Finally, glutathione-S-transferase (GST) is an antioxidant enzyme involved in xenobiotics detoxication and scavenging of lipid peroxides (Hermes-Lima, 2004; Manduzio et al., 2005).

In bivalves, many studies have investigated the effect of bacterial infection on gene expression of antioxidant enzymes but very few on their enzymatic activities. Expression of *RpSOD*, *RpGST* and *RpTrx* increased in gills and haemocytes of *R. philippinarum* during a short-term exposure to *V. tapetis* (Revathy et al., 2012a, 2012b; Umasuthan et al., 2012a, 2012b, 2012c). Although gene expressions of antioxidant enzymes are sometimes correlated to their activities (Genard et al., 2013), this is not always the case (Chen et al., 2002; Canesi et al., 2010; Beguel et al., 2013). Activities of SOD, CAT and GST increased in response to bacterial infection whereas other enzymes were not influenced or not examined (Canesi et al., 2010; Genard et al., 2013; Le Bris et al., 2015).

In addition to antioxidant enzymes, other immune-related enzymes are involved in pathogen destruction in bivalves. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) produces nitric oxide (NO), a RNS which putatively leads to the formation of peroxynitrite, nitrosothiols and other nitrogen derivative in cells that are harmful to pathogens (Hausladen and Stamler, 1999; Donaghy et al., 2015). Additionally, *in vitro* production of nitrites, which are NO breakdown products, is correlated to the concentration of *V. tapetis* in hemolymph and extrapallial

fluids of *R. philippinarum* (Jeffroy and Paillard, 2011). To our knowledge, iNOS activity has never been investigated in bivalves during exposure to pathogen.

Finally, phenoloxidases (PO) have a key role in innate immunity in bivalves by activating the melanization cascade which leads to the production of melanin and its derivatives (Aladaileh et al., 2007; Cerenius et al., 2008). These compounds exhibit fungistatic, bacteriostatic and antiviral properties (Cerenius et al., 2008; Luna-Acosta et al., 2011). Compared to other bivalve diseases, PO is particularly important for BRD as it contributes to the conchiolin deposit formation (Paillard et al., 1994). Bivalves exposed to pathogens generally exhibit higher PO activity than control (Butt and Raftos, 2008; Le Bris et al., 2015; Richard et al., 2015).

In bivalves, the haemocyte functions are influenced by dietary fatty acids (Delaporte et al., 2003, 2006, 2007; Dudognon et al., 2014). In a companion paper, we investigated the effect of diet on the dynamics of BRD in *R. philippinarum* in relation with reproductive status (Richard et al., submitted). We showed that disease prevalence and intensity as well as haemocyte parameters were not influenced by diet. However, sexual maturity enhanced BRD intensity, likely reflecting an energetic trade-off between reproduction and immunity.

Objectives of the present study were to investigate the effect of BRD development and algal diet quality during a *V. tapetis* exposure on (1) lipids, proteins and carbohydrates contents, and activity of enzymes related to energy metabolism such as hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK) and citrate synthase (CS); (2) activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT, GPx, (GR), (TrxR), and GST, and (3) activity of two immune-related enzymes, iNOS and PO. In this study, mantle of clams was individually sampled and pooled for the biochemical analysis according to diet, injection, tank replicate and BRD status at each time post-injection (2, 7 and 30 dpi). The originality of our work is that we clearly described the metabolic response of clams exposed to *V. tapetis* as a function of disease development. More particularly, we characterized the metabolic response associated to the appearance of disease clinical signs, so that we provide new biochemical indicators of disease resistance. Also, we obtained a more comprehensive view of the global antioxidant response of clam to the disease than previous studies which generally focused on SOD and CAT only.

2. Material and methods

2.1. Experimental design

Animals and experimental design are fully described in a companion paper (see Richard et al., submitted). Briefly, clams were acclimated four weeks with either *Isochrysis aff. galbana*, clone Tahitian (T-Iso) or *Chaetoceros calcitrans*, two algal species exhibiting differences in their biochemical compositions. Then, clams were injected with *Vibrio tapetis*, filtered-sea water (FSW) or not injected, and further monitored for 30 days. Clam shell, haemolymph were collected at 0, 2, 7, 14 and 30 dpi to assess disease prevalence, intensity and haemocytes parameters respectively. Additionally, sex and sexual maturity were evaluated and tested as internal parameters influencing BRD development. Whole clam mantle (Ma) and digestive gland (DG) were collected at all sampling times for biochemical analyses.

Algal cultures of *C. calcitrans* and T-Iso were collected three times during the course of the conditioning period for fatty acid composition analyses. Briefly, algae were filtered on pre-ignited GF/F filters, placed into 6 mL vials containing 3 mL of chloroform:methanol (2:1, v:v) and stored at -20°C until analyses.

Clams injected with *V. tapetis* and control animals injected with FSW collected at 2, 7 and 30 dpi were carefully dissected on ice. Ma and DG were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Samples were individually powdered using a Retsch MM 400 under liquid nitrogen. Then, a same amount of powders originating from the same condition of diet × injection treatment × BRD status × tank for each organ at each sampling time were pooled together to obtain enough biological materials for biochemical analysis (Table 1). Each individual had the same weight contribution to the pool. Clams injected with *V. tapetis* were classified as either BRD- (no clinical sign of infection) or BRD+ (visible brown ring). For control condition, visibly healthy clams were selected. Only mature male were analyzed because the sex ratio was in favor of males (1.5:1.0) and most of them were mature. Each pool consisted in 2 to 4 individuals per condition.

Ma were analyzed for carbohydrate and protein contents, immunity-, antioxidant- and metabolism-related enzymes activities at 2, 7 and 30 dpi. Immune related enzymes were analyzed through iNOS and PO activities, antioxidant enzymes through SOD, CAT, GPx, TrxR, GR, GST activities and metabolism-related enzymes through citrate synthase (CS), HK and pyruvate kinase (PK) activities.

Additionally, Ma were analyzed for fatty acid composition of polar lipids at 7 dpi to evaluate peroxidation index in membranes lipids. Fatty acids of neutral lipids were analyzed in DG at 2 dpi to verify that diet effectively influenced the biochemical composition of clams. Indeed, fatty acids composition of neutral lipids generally mirrors that of the food (Dalsgaard et al., 2003). For these analyses, powder of DG and Ma was transferred into 6mL vials containing chloroform:methanol mixture (2:1, v:v) and stored at -20°C until analyses.

2.2. Biochemical analyses

2.2.1. Fatty acid

Fatty acid composition was analyzed in total lipid of algae, in neutral lipids of clam DG at 2 dpi and in polar lipids of clam Ma at 7 dpi. Neutral and polar lipids were separated using a silica gel micro-column as described Marty et al. (1992). Briefly, aliquots of previous samples were evaporated to dryness and lipids extracts were recovered after three chloroform:methanol (98:2, v/v) washings. The resulting extracts were placed on top of a silica gel micro-column. Columns were washed with 10 mL chloroform:methanol (98:2, v/v) to elute neutral lipids followed by 15 mL of methanol to elute polar lipids. Then, a known amount of tricosanoic acid (23:0) was added as an internal standard in both fractions. Each lipid fraction was transesterified using 10% boron-trifluoride methanol (Metcalf and Schmitz, 1961) and analyzed in a gas chromatograph with an on-column injector, DB-Wax capillary column and a flame ionization detector. Fatty acids were then identified by comparison of retention times with standards and checked using a non-polar column.

2.2.2. Carbohydrate

Carbohydrates contents were analyzed using the method of Dubois et al. (1956). Carbohydrates were extracted in Ma in a 10 mM phosphate buffered saline (PBS) containing EDTA (1mM) and Triton® X-100 (0.1%) at the ratio of 50 mg of powder in 250 µL of buffer. Standard solution of 0.4 mg/mL glucose was serially diluted in PBS (ranging from 0.4 to 0.01 mg/mL) to provide a standard curve for the assay. Then, 500µL of 5% phenol solution was added to 250 µL of samples and standard solutions. The resulting solution was allowed to incubate during 40 min in the dark. The colorimetric reaction was initiated by addition of 2.5 mL H₂SO₄. After 40 min, all solutions were placed in cuvettes and absorbance was read at 490 and 600 nm on a Uvikon 941 (Kontron instruments). Carbohydrates contents were calculated using the standard curve and the following expression:

$$OD_s = OD_{s,490} - 1.5 \times (OD_{s,600} - 0.003)$$

With OD_s , the sample optical density of the sample; $OD_{s,490}$, the sample optical density at 490 nm and $OD_{s,600}$, the sample optical density at 600 nm. Results are expressed as mg per g wet weight.

2.2.3. Protein

For each sample, 50 mg of powder were homogenized in 250µL of extraction buffer using an Ultra-Turrax®. The extraction buffer used prior to SOD, PO, PK, HK, CS, GPx-t and GPx-Se enzymatic assays consisted in NaCl (150mM), Tris HCl (10mM), EDTA (1mM), EGTA (1mM), phosphatase inhibitor cocktail II (1%; Sigma-Aldrich), Triton® X-100 (1%; Sigma-Aldrich), CA-630 Igepal® (0.5%; Sigma-Aldrich) and 1 tablet/25mL of complete EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche) (Corporeau et al., 2012). The extraction buffer used prior to CAT, GR, GST, NOS and TrXR enzymatic assays consisted in Phosphate buffered saline (PBS 10mM; Sigma-Aldrich), EDTA (1mM) and Triton® X-100 (0.1%; Sigma-Aldrich). After homogenization, samples were centrifuged at 1000g for 10 minutes at 4°C to eliminate the lipid fraction of the samples and then centrifuged at 10000g for 45 minutes at 4°C. The resulting supernatants were split in 9-10 microtubes for protein and each enzyme assays and stored at -80°C.

Protein concentrations were evaluated in samples previously homogenized with each buffer by the Bradford method using the Biorad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad France) and Bovine Serum Albumin (BSA) as protein standard. Results are expressed as mg per g wet weight.

2.2.4. Enzyme

Activities were measured using 96-well microplates (Greiner 96-F-bottom) and Synergy HT (Bio-Tek), except for catalase activity which was measured using quartz cuvettes and Uvikon 941 (Kontron instruments).

Energy-related enzymes

Citrate Synthase (CS, EC 2.3.3.8) was assayed recording the conversion of DTNB into TNB (Childress and Somero, 1979). Briefly, 20 μL of protein supernatant were added in triplicate wells as well as serial dilutions of commercial CS from porcine heart (Sigma-Aldrich France) (ranging from 5 to 100 mU/mL) used as a standard for this reaction. One hundred and sixty μL of assay buffer (0.25 mM acetyl-CoA, 0.125 mM DTNB and 100 mM Tris-HCl) were added to wells and reaction was initiated by addition of 20 μL of 5 mM oxaloacetate. Blank wells consisted in replacing samples by extraction buffer. Absorbance was monitored during 10 min at 412 nm. Results are expressed in U/mg protein; one U being defined as the amount of enzyme catalyzing 1 μmole of TNB per min ($\epsilon_{\text{TNB}, 412} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Pyruvate Kinase (PK, EC 2.7.1.40) and hexokinase (HK, EC 2.7.1.1) activities were measured using Greenway and Storey (1999). Twenty μL of protein supernatant were loaded in triplicate wells and 20 μL of extraction buffer for the blank wells. For PK, 180 μL of assay buffer (100 mM imidazole-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 10 mM phosphoenolpyruvate, 2 mM NADH, 0.2% (v/v) rotenone saturated ethanol and 1 U/mL lactate dehydrogenase) were added in the wells and the reaction was monitored during 15 min at 340 nm. For HK, reaction was initiated by addition of 200 μL of assay buffer (100 mM Tris, 1 mM EDTA, 2 mM MgCl_2 , 5 mM glucose, 1 mM ATP, 0.2 mM NADP^+ and 1 U/mL Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase) and reaction kinetics was followed during 15 min at 340 nm. Results are expressed as U/mg protein; one U being defined as the amount of enzyme oxidizing 1 μmole of NADH or NADP^+ (using $\epsilon_{\text{NADH or NADP}^+, 340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Antioxidant enzymes

Total Superoxide Dismutase (t-SOD, EC 1.15.1.1) activity was measured using the SOD Assay Kit (Sigma-Aldrich, France) following a modified procedure (Richard et al., 2015). Briefly, the inhibition of the xanthine/xanthine oxidase complex was followed recording the absorbance at 440 nm after 20 minutes of incubation at 25°C. Additionally, mitochondrial SOD (Mn SOD) activity was assayed by addition of potassium cyanide, which was found to inhibit specifically cytosolic SOD (Cu-Zn SOD) at concentrations above 2mM in *Mytilus edulis* (Manduzio et al., 2003). Thus, a range of potassium cyanide concentrations were previously tested (0 – 10 mM) and the 5 mM concentration was selected for Mn SOD assay in clams. Mn SOD activity and subsequently Cu-Zn SOD activity (as being the activity difference between t-SOD and Mn SOD) were assayed using the same kit and adding 5 mM potassium cyanide in the assay buffer. All SOD activities are expressed in U/mg total protein where one unit is the amount of enzyme necessary for inhibiting by 50% the xanthine/xanthine oxidase complex.

Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) activity was assessed following Aebi (1984). Briefly, 8 µL of protein supernatant were added to 792 µL of hydrogen peroxide solution (10 mM) to initiate the reaction. Absorbance was immediately recorded for 90 sec at 240 nm. Blank consisted in extraction buffer instead of sample. Absorbance of the blank was subtracted to that of sample. Activities are expressed in U/mg protein where 1 U is the amount of enzyme necessary for catalyzing 1 µmole of H₂O₂ per min (using $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2, 240} = 0.04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Total Glutathione Peroxidase and Selenium Glutathione Peroxidase (t-GPx and Se-GPx, EC 1.11.1.9) activities was measured by monitoring the decrease in NADPH concentration at 340 nm (McFarland et al., 1999). The assay buffer consisted in 62.5 mM Phosphate Buffer, 6.25 mM EDTA, 2.5 mM GSH, 2.5 U/mL GR, 0.5 mM NADPH. For t-GPx, Cumene Hydroperoxide (1.875mM) was added to the assay buffer. For Se-GPx, NaN₃ (1.25 mM) and H₂O₂ (0.3125 mM) were added. Fifty µL of protein supernatants were placed in the wells and the reaction started by addition of 200 µL of the assay buffer. NADPH loss was recorded during 3 min at 25°C. Blank consisted in extraction buffer instead of sample. Absorbance of the blank was subtracted to that of sample. Enzyme activities are reported as

U/mg protein where one unit is the amount of enzyme necessary for oxidizing 1 μ mole of NADPH per min (using $\epsilon_{\text{NADPH}, 340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Glutathione Reductase (GR, EC 1.8.1.7) was assessed following Cribb et al. (1989). Briefly, 20 μ L of protein supernatants were loaded in triplicate wells and the reaction was initiated by addition of 170 μ L of assay buffer (100 mM Sodium Phosphate Buffer, 0.7 mM NADPH, 0.09 mM DTNB, 0.2 mM GSSG). Kinetics of GR activity was assayed during 3 min at 412 nm. Blank consisted in extraction buffer instead of sample. Absorbance of the blank was subtracted to that of sample. Activities are expressed as U/mg protein; one unit being defined as the amount of enzyme catalyzing 1 μ mole of DTNB per min (using $\epsilon_{\text{DTNB}, 412} = 14.15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Glutathione-S-Transferase (GST, EC 2.5.1.18) was measured following McFarland et al. (1999). Briefly, 15 μ L of protein supernatant or extraction buffer (for blanks) were placed in triplicate wells. Reaction was initiated by the addition of 200 μ L of assay buffer (200 mM Phosphate Buffer, 1 mM CDNB, 1 mM GSH) and absorbance was recorded for 3 min at 340 nm. Absorbance of the blank was subtracted to that of sample. GST activities are reported as U/mg protein; one U being defined as the amount of enzyme catalyzing 1 μ mole of CDNB per min (using $\epsilon_{\text{CDNB}, 340} = 9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Thioredoxin Reductase (TrxR, EC 1.8.1.9) was assessed following the conversion of DTNB into TNB (Smith and Levander, 2002). Briefly, 50 μ L of protein supernatant were loaded in triplicate wells and 200 μ L of assay buffer (62.5 mM Phosphate Buffer, 12.5 mM EDTA, 0.3 mM NADPH and 3.125 M DTNB) were added to initiate the reaction. Additionally, each sample was assayed in presence of 20 μ M aurothioglucose (an inhibitor of TrxR) in order to assess non-TrxR activities contributions. After one minute of incubation at room temperature, kinetics was followed for 3 min at 412 nm. Blank consisted in extraction buffer instead of sample. Absorbance of the blank was subtracted to that of sample. Activities are expressed as U/mg protein; one U being defined as the amount of enzyme producing 1 μ mole of TNB per min ($\epsilon_{\text{TNB}, 412} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Immune related enzymes

For Inducible Nitric Oxide Synthase activity (iNOS, EC 1.14.13.39) assay, we developed a non-radioactive method (appendix 1). Briefly, 55 μL of protein supernatants were incubated during 30 minutes at 37°C with 5 μL of assay buffer: Tris buffer (20 mM pH 7.4), NADPH (1 mM), L-Arginine (1 mM), 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (10 μM), FAD+ (5 μM). Samples and blanks were also incubated with the same assay buffer containing L-NMMA (200 μM), a specific inhibitor of NOS, in order to assess specifically NOS activity. Blanks were run (PBS buffer instead of samples) and iNOS from mouse was used as a standard for range curve. The reactions were stopped by addition of 200 μL of the color developing reagent (COLDER, see description in appendix 1) and the microplate was incubated at 95°C for 15 minutes. After 10 minutes at room temperature, L-citrulline formation was assessed by reading absorbance at 530 nm. Absorbance of the blank and of samples incubated with L-NMMA was subtracted to that of samples. Activities are expressed in U/mg protein where 1 U is the amount of enzyme necessary for producing 1 μmole of L-citrulline per min.

Phenoloxidase activity was assessed according to Le Bris et al. (2013). Briefly, 50 μL of protein supernatants or extraction buffer (blank) were incubated with 50 μL of Tris-HCl buffer (0.10 M, pH 8.0) for 10 minutes at 25°C. The reaction was initiated by addition of 100 μL 0.04 M L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), a common substrate for the three PO subclasses. The increase in absorbance due to L-DOPA oxidation was monitored for 30 minutes at 492 nm. The spontaneous oxidation of L-DOPA (blank) was also measured and subtracted to from samples values. PO specific activities are expressed in units per mg protein using the following expression:

$$PO (U/mg) = (\Delta OD/min \times f_{d,s})/[protein]$$

With $\Delta OD/min$, the value of increment of optical density per minute; $f_{d,s}$, the dilution factor applied to the sample and $[protein]$, the protein concentration of the sample in mg/mL.

2.3. Statistical analyses

Given the unbalanced nature of the sampling design, injection, BRD status and sampling time were merged as one explanatory variable hereafter referred to as “treatment”. Treatments consist in seven conditions: control at 2 dpi, BRD- at 2dpi, control at 7 dpi, BRD- at 7 dpi, BRD+ at 7 dpi, control at 30 dpi and BRD+ at 30 dpi.

Non parametric Permutational Multivariate Analyses of Variance (PERMANOVA, (Anderson, 2001) were conducted on all biochemical variables for Ma and DG. This method allows partitioning the variance in response variables attributed to each explanatory variable (diet and treatment) and their interactions. A pseudo F-ratio defined as the ratio of dissimilarity within a treatment and between treatments is computed and its significance was tested by 999 permutations.

Then, ordination analyses were performed using Principal Component Analysis (PCA) to plot individuals, variables and correlations between variables. A posteriori comparison tests were performed for each variable (ANOVA) in order to estimate the significance of results obtained with PERMANOVA. These analyses investigated the effect of diet, treatment and their interactions on biochemical parameters of clams. Analyses were first conducted with data collected at all sampling times and secondly for each sampling times.

Statistical analyses were carried out using R 3.1.2 Software (R Core Team, 2011). PERMANOVA were achieved using *adonis* function and the homogeneity of multivariate dispersions were tested using *betadisper* function from the *vegan* package (Oksanen et al., 2015). The *rda* function from *vegan* package was used for PCAs analyses and the subsequent biplots were drawn using *ggplot2* package (Wickham and Chang, 2015). ANOVA were performed using the *Anova* function from *car* package (Fox and Weisberg, 2010).

3. Results

3.1. Dietary fatty acid signatures

The two cultured algae exhibited typical fatty acid profiles: *C. calcitrans* is rich in 20:5n-3 and 20:4n-6 and poor in 22:6n-3 whereas T-*Iso* is rich in 22:6n-3 and deficient in 20:5n-3 and poor in 20:4n-6 (Table 2). Neutral lipids of clam DG at the end of the conditioning period clearly mirrored the fatty acid composition of the diet. For instance, DG of clams fed *C. calcitrans* were rich in 20:4n-6 and 20:5n-3 and poor in 22:6n-3 while this is the inverse pattern for those fed T-*Iso* (Table 3).

However, polar lipids of clam Ma at 7 dpi were much less influenced by the diet. Indeed, levels of 20:4n-6, 20:5n-3, 22:6n-3, in polar lipids of animals fed *C. calcitrans* were 5.4%, 7.4%, and 19.5% compared to 5.0%, 5.7%, and 21.6% in those fed T-*Iso*, suggesting that selective incorporation/elimination of dietary fatty acids has occurred in this organ.

3.2. Metabolic response of clam

Overall, proximate composition (lipid, protein and carbohydrate contents) and activities of enzymes related to energy, antioxidant and immunity in Ma of clams were not influenced by diet. However, most of these variables were greatly influenced by treatment (PERMANOVA, $r^2=0.30$, $F=2.19$, $p=0.029$). Principal component analysis (PCA) and PERMANOVA by sampling times showed that there was no significant effect at 30 dpi (Table 4).

At 2 and 7 dpi, activities of t-SOD, CAT, Se-GPx, GR, GST, iNOS and PO were markedly influenced by the interaction of diet x treatment (PERMANOVA, $r^2=0.28$, $F=4.08$, $p<0.01$). However, the effect of diet was not significant when PCAs and PERMANOVAs are conducted by day (Table 4). We therefore consider only treatment effects.

Principal component analysis allows clearly discriminating clams injected with *V. tapetis* and control at 2 dpi (Figure 1). At 7 dpi, PCA discriminates clams injected with *V. tapetis* which exhibited clinical signs of disease development (BRD+) from those which were visibly healthy (BRD-) and control. Activities of t-SOD, CAT, Se-GPx, GR and PO were

correlated together along with positive values of the first principal component axis (PC1) whereas proximate compositions were correlated together along with PC1 negative values. Activities of Cu/Zn-SOD and TrxR were respectively correlated with negative and with positive values of the second principal component (PC2).

At 2 dpi, activities of Cu/Zn-SOD and CAT were not significantly influenced by injection x BRD status, although they were respectively 23 % lower and 27 % higher in BRD- than in control (Figure 2, Appendix 2). Also, activity of Se-GPx in BRD- was 46 % lower than that of control. Finally, activity of iNOS was ca. 24 % higher in BRD- than that of control.

At 7 dpi, activities of antioxidant enzymes (t-SOD, CAT, GR) and PO in BRD- were 20 to 40 % higher than those recorded in other animals, regardless of sampling times and BRD status (Figure 2, Appendix 2). Activity of Se-GPx in BRD+ was 54 % lower than that of BRD- at 7 dpi (Figure 2, Appendix 2). Activity of GST was not significantly impacted by treatment at 7 dpi, although it was 29 % lower in BRD+ than that of control and BRD- (Appendix 2). Finally, activity of iNOS in BRD+ was 30 % higher than that of control at 2 and 7 dpi and BRD- at 7 dpi (Figure 2, Appendix 2).

4. Discussion

4.1. Diet effect on clam response to *V. tapetis*

The two culture algae exhibited typical fatty acid profiles which were mirrored in the neutral lipids of the DG as previously reported in other bivalve species (Delaunay et al., 1993; Soudant et al., 1996a, 1999). However, polar lipids of clam MA at 7 dpi were much less influenced by the diet, suggesting that selective incorporation of dietary fatty acids has occurred in this organ. Although selective incorporation of essential fatty acids in polar lipids is common in bivalves (Delaunay et al., 1993; Soudant et al., 1996a; Copeman et al., 2002; Pernet and Tremblay, 2004), this phenomenon has rarely been observed to such an extent. For instance, polar lipids of clam haemocytes are reflective of the diet and clearly influence their functions (Delaporte et al., 2003, 2006, 2007; Dudognon et al., 2014). Our result may then reflect differences between organs ability to regulate PUFAs in polar lipids and/or

differences related to batch origin (Napolitano and Ackman, 1992; Soudant et al., 1999; Pernet et al., 2008).

Finally, the fact that dietary deficiencies were compensated in clam mantle may explain that disease prevalence and intensities, as well as activities of immunity-, antioxidant- and energy metabolism-related enzymes were not influenced by diet in this organ.

4.2. Metabolic response of clam to *V. tapetis*

Activities of antioxidant and immune-related enzymes of clams injected with *V. tapetis* changed between 2 dpi and 7 dpi concomitantly with increasing prevalence of BRD and changes in BRD status (Richard et al., submitted). In our study, biochemical parameters were measured in mature males only. Therefore, our results may not be fully representative of clam populations which generally consist in a mixture of males and females at different reproductive stages. However, the effects of sex and reproductive stage on enzyme activity in bivalves have received very little attention. The only available information is that sex and reproductive investment do not influence activities of antioxidant enzymes in gills of oysters (Beguel et al., 2013).

4.2.1. Early response at 2 dpi

In *V. tapetis* injected clams, activity of Cu/Zn-SOD tend to decrease (-23 %) whereas activity of iNOS (+24 %) was significantly higher than control, likely leading to higher concentration of $O_2^{\bullet-}$ and NO in Ma of BRD-. Indeed, previous studies reported that productions of ROS and RNS are enhanced to neutralize pathogens in bivalves (Arumugan et al., 2000; Tafalla et al., 2002; Bugge et al., 2007; Villamil et al., 2007; Costa et al., 2008). More particularly, enhancement of iNOS in BRD- agree with an *in vitro* analysis of body fluids of clams exposed to *V. tapetis* that showed higher levels of nitrates and nitrites, two breakdown products of NO decomposition as compared to unexposed controls (Jeffroy and Paillard, 2011). Finally, increasing concentrations of both $O_2^{\bullet-}$ and NO might lead to the formation of peroxynitrite (ONOO-), a RNS highly toxic to pathogen (Torreilles and Guerin, 1999; Donaghy et al., 2015).

Activity of Se-GPx, an enzyme involved in peroxides decomposition, was markedly lowered in BRD- (-46 % compared to control), suggesting ROS accumulation in Ma. However, this effect might be counterbalanced by the activity of CAT, an enzyme also involved in peroxide detoxication, which tended to increase in BRD- (+27 % compared to control). The complementary role of CAT and GPx has already been observed in clams *Meretrix meretrix* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* (Wang et al., 2011, 2013).

4.2.2. Late response at 7 dpi

Resistance to BRD clinical signs appearance is associated to higher detoxication of ROS and PO activities

Activities of several antioxidant enzymes (t-SOD, CAT) were markedly increased in BRD- compared to BRD+ and control at 2 and 7 dpi (respectively, +22 % and +41 %). Over-activation of these antioxidant enzymes in BRD- coincided with an increase in GR activity (+22 % compared to control and BRD+ at 2 and 7 dpi), likely reflecting the regulation of glutathione redox status for its further use both Se-GPx functioning and also as a non-enzymatic antioxidant (Winston and Digiulio, 1991; Hermes-Lima, 2004). Overall, the enhancement of antioxidant pathway in BRD- could indicate an efficient ROS scavenging compared to BRD+. These results showed that over-activation of antioxidant enzymes in clams may thus be related to a resistance to BRD clinical signs appearance. Although increasing antioxidant enzymes activities during early exposure of bivalves to vibriosis was already reported (Canesi et al., 2010; Genard et al., 2013), this phenomenon has never been related to the resistance to BRD clinical signs appearance so far.

Concomitantly, the activity of PO was 31 % higher in BRD- compared to that of BRD+ and control at 2 and 7 dpi. Interestingly, oysters *Saccostrea glomerata* selectively bred for QX disease resistance exhibit a similar increase in PO activity compared to wild animals (Butt and Raftos, 2008). It is therefore likely that increased in PO activity in clams exposed to *V. tapetis* is related to a resistance to BRD clinical signs appearance as previously suggested for antioxidant enzymes.

Taken together, these results suggest that in *V. tapetis*-challenged clams at 7 dpi, a resistance to BRD clinical signs appearance can be measured and was associated to

detoxification of ROS by antioxidant enzymes and the production of toxic quinones through PO.

Appearance of BRD clinical signs is associated to lower GST activities and higher iNOS activities

The activity of GST, an enzyme associated to xenobiotics and lipid peroxides detoxication, tended to be lower in BRD+ compared to that of BRD- and control at 7 dpi (-29 %). Concomitantly, t-SOD, CAT and Se-GPx activities of BRD+ were lower than those of BRD- at 7 dpi (respectively, -22 %, -41 % and -54 %). Altogether, our results suggest that BRD+ were exposed to higher level of lipid peroxidation and ROS at 7 dpi than BRD- (Viarengo et al., 1991; Power and Sheehan, 1996; Manduzio et al., 2005). However, unsaturation index of polar lipids, an indicator of lipid peroxidation (Hulbert, 2003; Munro and Blier, 2012), was similar in BRD-, BRD+ and control at 7 dpi, so that reduction in GST and antioxidant activities in BRD+ was not sufficient to alter the polar lipids of clams.

Besides, the activity of iNOS was 20% higher in BRD+ compared to that of control clams at 2 and 7 and BRD- at 7 dpi, likely leading to higher levels of NO and RNS in these animals as previously reported (Jeffroy and Paillard, 2011). Over activation of iNOS had already been reported at 2 dpi as an early response to *V. tapetis* injection so that BRD+ at 7 dpi may keep on producing RNS to fight bacterial infection.

5. Conclusion

Antioxidant and immune responses were strongly influenced by BRD development in clams exposed to *V. tapetis*. An early response was observed at 2 dpi in visibly healthy clams (BRD-). This early response consisted in the decrease of antioxidant activities, likely leading to accumulation of ROS to cope with bacterial infection. Then, at 7 dpi, clams that remained BRD- exhibited an over-activation of PO and antioxidant enzymes compared to diseased animals (BRD+). Therefore, activities of antioxidant and immune related enzymes are biomarkers of resistance to BRD development in clam. This study provides a better understanding of the antioxidant response of clams to the disease and it shows for the first time that iNOS takes part in the *in vivo* response of a bivalve species to its pathogen.

Acknowledgements

This work was supported by the "Laboratoire d'Excellence" LabexMER (ANR-10-LABX-19) and co-funded by a grant from the French government under the program "Investissements d'Avenir" and by a grant from the Regional Council of Brittany. This work was also supported by University of Western Brittany. We would first like to thank F. Fonteneau for providing the clams, C. Quéré for her help with fatty acid analyses, P. Miner for his help with experimental design and maintenance, and A. Bidault, N. Le Goïc, F. Nunez, H. Hégaret, C. Fabioux, I. Paul-Pont, F. Le Grand, F. Riera, A.L. Cassone, P. Le Souchu, A. Muir, E. Harney, Y. Epelboin, M. Fuhrmann, M. Provost, L. Frère, F. Boullot, B. Dubief, M. Czamanski, R. Morvezen, V. Foulon, M. Protat, A. Guyon, and L. Delisle for their help with samplings and O. Gauthier for advices in statistical analysis.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase Invitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Aladaileh, S., Nair, S.V., Raftos, D.A., 2007. Induction of phenoloxidase and other immunological activities in Sydney rock oysters challenged with microbial pathogen-associate molecular patterns. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 1196–1208. doi:10.1016/j.fsi.2007.05.003
- Allam, B., Paillard, C., Ford, S.E., 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis. Aquat. Organ.* 48, 221–231. doi:10.3354/dao048221
- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46. doi:10.1046/j.1442-9993.2001.01070.x
- Arumugan, M., Romestand, B., Torreilles, J., 2000. Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquat. Living Resour.* 13, 173–177. doi:10.1016/S0990-7440(00)00150-9
- Beguel, J.-P., Huvet, A., Quillien, V., Lambert, C., Fabioux, C., 2013. Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 157, 63–71. doi:10.1016/j.cbpc.2012.10.004
- Bugge, D.A., Hegaret, H., Wikfors, G.H., Allam, B., 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 188–196. doi:10.1016/j.fsi.2006.10.006
- Butt, D., Raftos, D., 2008. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 299–306. doi:10.1016/j.dci.2007.06.006
- Canesi, L., Barmo, C., Fabbri, R., Ciacci, C., Vergani, L., Roch, P., Gallo, G., 2010. Effects of vibrio challenge on digestive gland biomarkers and antioxidant gene expression in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 152, 399–406. doi:10.1016/j.cbpc.2010.06.008
- Cerenius, L., Lee, B.L., Soderhall, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29, 263–271. doi:10.1016/j.it.2008.02.009
- Chen, G.A., Gharib, T.G., Huang, C.C., Taylor, J.M.G., Misek, D.E., Kardina, S.L.R., Giordano, T.J., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., Hanash, S.M., Beer, D.G., 2002. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 304–313. doi:10.1074/mcp.M200008-MCP200
- Childress, J., Somero, G., 1979. Depth-Related Enzymic Activities in Muscle, Brain and Heart of Deep-Living Pelagic Marine Teleosts. *Mar. Biol.* 52, 273–283. doi:10.1007/BF00398141
- Chu, F.L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves.
- Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A., Harel, M., 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210, 285–304. doi:10.1016/S0044-8486(01)00849-3
- Corporeau, C., Vanderplancke, G., Boulais, M., Suquet, M., Quere, C., Boudry, P., Huvet, A., Madec, S., 2012. Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific

- oyster *Crassostrea gigas*. *J. Proteomics* 75, 5554–5563. doi:10.1016/j.jprot.2012.07.040
- Costa, M.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 Shellfish Immunol.* 24, 498–505. doi:10.1016/j.fsi.2007.10.003
- Cribb, A., Leeder, J., Spielberg, S., 1989. Use of a Microplate Reader in an Assay of Glutathione-Reductase Using 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoic Acid). *Anal. Biochem.* 183, 195–196. doi:10.1016/0003-2697(89)90188-7
- Dalsgaard, J., St John, M., Kattner, G., Muller-Navarra, D., Hagen, W., 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv. Mar. Biol. Vol 46* 46, 225–340. doi:10.1016/S0065-2881(03)46005-7
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Jegaden, M., Moal, J., Pouvreau, S., Degremont, L., Boudry, P., Samain, J.-F., 2007. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 353, 45–57. doi:10.1016/j.jembe.2007.09.003
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Segueineau, C., Samain, J.-F., 2006. Impact of 20 : 4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* 41, 567–576. doi:10.1007/s11745-006-5006-9
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quere, 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*. *J. Exp. Biol.* 206, 3053–3064. doi:10.1242/jeb.00518
- Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J., Samain, J., 1993. The Effect of Monospecific Algal Diets on Growth and Fatty-Acid Composition of *Pecten-Maximus* (I) Larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 173, 163–179. doi:10.1016/0022-0981(93)90051-O
- Development Core Team, R., 2011. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing.
- Donaghy, L., Hong, H.-K., Jauzein, C., Choi, K.-S., 2015. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 91–97. doi:10.1016/j.fsi.2014.10.030
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. doi:10.1021/ac60111a017
- Dudognon, T., Lambert, C., Quere, C., Auffret, M., Soudant, P., Kraffe, E., 2014. Mitochondrial activity, hemocyte parameters and lipid composition modulation by dietary conditioning in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Comp. Physiol. B-Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 184, 303–317. doi:10.1007/s00360-013-0800-1
- Ellis, R.P., Parry, H., Spicer, J.I., Hutchinson, T.H., Pipe, R.K., Widdicombe, S., 2011. Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 1209–1222. doi:10.1016/j.fsi.2011.03.017
- Flye-Sainte-Marie, J., Pouvreau, S., Paillard, C., Jean, F., 2007. Impact of Brown Ring Disease on the energy budget of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 349, 378–389. doi:10.1016/j.jembe.2007.05.029
- Fox, J., Weisberg, S., 2010. *An R Companion to Applied Regression*. SAGE.

- Genard, B., Miner, P., Nicolas, J.-L., Moraga, D., Boudry, P., Pernet, F., Tremblay, R., 2013. Integrative Study of Physiological Changes Associated with Bacterial Infection in Pacific Oyster Larvae. *Plos One* 8, e64534. doi:10.1371/journal.pone.0064534
- Gouletquer, P., Université de Bretagne occidentale, 1989. Etude des facteurs environnementaux intervenant sur la production de la palourde japonaise d'élevage *Ruditapes philippinarum*. [s.n.], [S.l.].
- Greenway, S.C., Storey, K.B., 1999. The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 242, 259–272. doi:10.1016/S0022-0981(99)00103-3
- Hausladen, A., Stamler, J.S., 1999. Nitrosative stress. *Oxid. Antioxid. Pt B* 300, 389–395.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals, in: Ph.D, K.B.S. (Ed.), *Functional Metabolism*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 319–368.
- Hulbert, A.J., 2003. Life, death and membrane bilayers. *J. Exp. Biol.* 206, 2303–2311.
- 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 Shellfish Immunol.* 31, 1137–1141. doi:10.1016/j.fsi.2011.10.008
- Le Bris, C., Paillard, C., Stiger-Pouvreau, V., Guerard, F., 2013. Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum*: Characterization and kinetic properties. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1804–1812. doi:10.1016/j.fsi.2013.09.009
- Le Bris, C., Richard, G., Paillard, C., Lambert, C., Seguineau, C., Gauthier, O., Pernet, F., Guerard, F., 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* - Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 16–24. doi:10.1016/j.fsi.2014.10.021
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology, in: *Annual Review of Physiology*. pp. 253–278.
- Luna-Acosta, A., Saulnier, D., Pommier, M., 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 Shellfish Immunol.* 31, 795–800. doi:10.1016/j.fsi.2011.07.016
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ* 2.
- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J., Samain, J., 1992. Changes in the Fatty-Acid Composition of *Pecten-Maximus* (I) During Larval Development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 221–234. doi:10.1016/0022-0981(92)90051-B
- McFarland, V.A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., McCant, D.D., 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 236–241.
- Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A., 1961. The Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas Chromatographic Analysis. *Anal. Chem.* 33, 363–364. doi:10.1021/ac60171a016
- Munro, D., Blier, P.U., 2012. The extreme longevity of *Arctica islandica* is associated with increased peroxidation resistance in mitochondrial membranes. *Aging Cell* 11, 845–855.
- Napolitano, G., Ackman, R., 1992. Anatomical Distributions and Temporal Variations of Lipid Classes in Sea Scallops *Placopecten-Magellanicus* (gmelin) from Georges Bank (nova-Scotia). *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 103, 645–650. doi:10.1016/0305-0491(92)90384-4

- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2015. vegan: Community Ecology Package.
- Paillard, C., 2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Living Resour.* 17, 467–475. doi:10.1051/alr:2004053
- Paillard, C., Maes, P., 1995. The Brown Ring Disease in the Manila Clam, *Ruditapes-Philippinarum* .1. Ultrastructural Alterations of the Periostacal Lamina. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 91–100. doi:10.1006/jipa.1995.1015
- Paillard, C., Maes, P., 1994. Brown Ring Disease in the Manila Clam *Ruditapes-Philippinarum* - Establishment of a Classification-System. *Dis. Aquat. Organ.* 19, 137–146. doi:10.3354/dao019137
- Paillard, C., Maes, P., Oubella, R., 1994. Brown ring disease in clams. *Annu. Rev. Fish Dis.* 4, 219–240.
- Pernet, F., Tremblay, R., 2004. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 310, 73–86. doi:10.1016/j.jembe.2004.04.001
- Pernet, F., Tremblay, R., Redjah, I., Sevigny, J.-M., Gionet, C., 2008. Physiological and biochemical traits correlate with differences in growth rate and temperature adaptation among groups of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Exp. Biol.* 211, 969–977. doi:10.1242/jeb.014639
- Pipe, R., Coles, J., 1995. Environmental Contaminants Influencing Immune Function in Marine Bivalve Mollusks. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 581–595. doi:10.1016/S1050-4648(95)80043-3
- Plana, S., 1995. Perturbations de la glande digestive et du métabolisme chez la palourde aquacole, *Ruditapes Philippinarum*, affectée par la maladie de l'anneau brun (PhD thesis). Université de Bretagne occidentale, France.
- Plana, S., Siquin, G., Maes, P., Paillard, C., LePennec, M., 1996. Variations in biochemical composition of juvenile *Ruditapes philippinarum* infected by a *Vibrio* sp. *Dis. Aquat. Organ.* 24, 205–213. doi:10.3354/dao024205
- Power, A., Sheehan, D., 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 114, 99–103. doi:10.1016/0742-8413(96)00024-2
- Powis, G., Montfort, W.R., 2001. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 421–455. doi:10.1146/annurev.biophys.30.1.421
- Revathy, K.S., Umasuthan, N., Lee, Y., Choi, C.Y., Whang, I., Lee, J., 2012a. First molluscan theta-class Glutathione S-Transferase: Identification, cloning, characterization and transcriptional analysis post immune challenges. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 162, 10–23. doi:10.1016/j.cbpb.2012.02.004
- Revathy, K.S., Umasuthan, N., Lee, Y., Whang, I., Kim, H.C., Lee, J., 2012b. Cytosolic thioredoxin from *Ruditapes philippinarum*: Molecular cloning, characterization, expression and DNA protection activity of the recombinant protein. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 85–92. doi:10.1016/j.dci.2011.06.006
- Richard, G., Le Bris, C., Guerard, F., Lambert, C., Paillard, C., 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* - Part II: Combined effect of temperature and two *V-tapetis* strains. *Fish Shellfish Immunol.* 44, 79–87. doi:10.1016/j.fsi.2014.12.039

- Richard, G., Miner, P., Bidault, A., Pernet, F., Corporeau, C., Boudry, P., Guérard, F., Paillard, C., Lambert, C., n.d. Brown Ring Disease in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: effect of algal diet quality and reproduction status.
- Sies, H., 1993. Strategies of Antioxidant Defense. *Eur. J. Biochem.* 215, 213–219. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x
- Smith, A.D., Levander, O.A., 2002. High-throughput 96-well microplate assays for determining specific activities of glutathione peroxidase and thioredoxin reductase. *Protein Sens. React. Oxyg. Species Pt Selenoproteins Thioredoxin* 347, 113–121.
- Soudant, P., Chu, F.-L.E., Volety, A., 2013. Host-parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. *J. Invertebr. Pathol.* 114, 196–216. doi:10.1016/j.jip.2013.06.001
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Robert, R., Quere, C., LeCoz, J.R., Samain, J.F., 1996. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture* 143, 361–378. doi:10.1016/0044-8486(96)01276-8
- Soudant, P., Van Ryckeghem, K., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., Sorgeloos, P., 1999. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 123, 209–222. doi:10.1016/S0305-0491(99)00063-2
- Tafalla, C., Novoa, B., Figueras, A., 2002. 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.* 132, 423–431.
- Torreilles, J., Guerin, M.C., 1999. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes in vitro. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 509–518. doi:10.1006/fsim.1998.0200
- 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. *J. Invertebr. Pathol.* 104, 8–16. doi:10.1016/j.jip.2009.12.007
- Umasuthan, N., Bathige, S.D.N.K., Revathy, K.S., Lee, Y., Whang, I., Choi, C.Y., Park, H.-C., Lee, J., 2012a. A manganese superoxide dismutase (MnSOD) from *Ruditapes philippinarum*: Comparative structural- and expressional-analysis with copper/zinc superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) and biochemical analysis of its antioxidant activities. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 753–765. doi:10.1016/j.fsi.2012.06.024
- Umasuthan, N., Revathy, K.S., Lee, Y., Whang, I., Choi, C.Y., Lee, J., 2012b. A novel molluscan sigma-like glutathione S-transferase from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: Cloning, characterization and transcriptional profiling. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 155, 539–550. doi:10.1016/j.cbpc.2012.01.001
- Umasuthan, N., Revathy, K.S., Lee, Y., Whang, I., Lee, J., 2012c. Mitochondrial thioredoxin-2 from Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) is a potent antioxidant enzyme involved in antibacterial response. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 513–523. doi:10.1016/j.fsi.2011.12.010
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D., Orunesu, M., 1991. Age-Related Lipid-Peroxidation in the Digestive Gland of Mussels - the Role of the Antioxidant Defense Systems. *Experientia* 47, 454–457. doi:10.1007/BF01959942

- Villamil, L., Gomez-Leon, J., Gomez-Chiarri, M., 2007. Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 968–977. doi:10.1016/j.dci.2007.01.006
- Wang, C., Huan, P., Yue, X., Yan, M., Liu, B., 2011. Molecular characterization of a glutathione peroxidase gene and its expression in the selected *Vibrio*-resistant population of the clam *Meretrix meretrix*. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 1294–1302. doi:10.1016/j.fsi.2011.03.015
- Wang, C., Yue, X., Lu, X., Liu, B., 2013. The role of catalase in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 91–99. doi:10.1016/j.fsi.2012.10.013
- Wickham, H., Chang, W., 2015. *ggplot2: An Implementation of the Grammar of Graphics*.
- Winston, G., Digiulio, R., 1991. Prooxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic Organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161. doi:10.1016/0166-445X(91)90033-6

Table 1: Sampling design. Clams were fed *T-Isochrysis aff. galbana*, clone Tahitian (*T-Iso*) or *Chaetoceros calcitrans* (*C. calcitrans*) and injected with *Vibrio tapetis* or filtered sea-water (FSW, Control). Clams injected with *V. tapetis* were either BRD- (no clinical sign of infection) or BRD+ (visible brown ring). Abbreviations: P, pool number; n, number of individuals for the pool; T, tank number; dpi, days post-injection.

Diet	Injection	BRD status	Time (dpi)		
			2	7	30
<i>C. calcitrans</i>	FSW	Control	P1 n=3 T4	P1 n=2 T4	P1 n=2 T4
			P2 n=3 T4	P2 n=2 T5	P2 n=3 T5
			P3 n=3 T5	P3 n=3 T5	P3 n=4 T6
			P4 n=3 T6	P4 n=3 T6	P4 n=3 T6
<i>C. calcitrans</i>	<i>V. tapetis</i>	BRD-	P1 n=3 T1		
			P2 n=3 T2		
			P3 n=3 T3		
<i>C. calcitrans</i>	<i>V. tapetis</i>	BRD+		P1 n=3 T1	
				P2 n=3 T2	P1 n=3 T1
				P3 n=4 T2	P2 n=3 T2
				P4 n=3 T3	P3 n=4 T3
				P5 n=3 T3	
<i>T-Iso</i>	FSW	Control	P1 n=3 T13	P1 n=2 T13	
			P2 n=3 T14	P2 n=3 T14	P1 n=3 T14
			P3 n=3 T14	P3 n=4 T15	P2 n=3 T15
			P4 n=3 T15		
<i>T-Iso</i>	<i>V. tapetis</i>	BRD-	P1 n=3 T10		
			P2 n=3 T10	P1 n=2 T10	
			P3 n=5 T11	P2 n=2 T10	
			P4 n=3 T12		
<i>T-Iso</i>	<i>V. tapetis</i>	BRD+		P1 n=3 T11	P1 n=5 T10
				P2 n=3 T12	P2 n=4 T11

Table 2: Percent composition of the main long-chain polyunsaturated fatty acids in total lipids of *T-Isochrysis aff. galbana*, clone Tahitian (*T-Iso*) and *Chaetoceros calcitrans* (*C. calcitrans*) and neutral lipids of the digestive gland of control clams (DG) at 2 dpi. Values are mean \pm standard deviations, expressed as percentage of total fatty acids (n=3 samples).

Fatty acid	Algae		DG	
	<i>C. calcitrans</i>	<i>T-Iso</i>	<i>C. calcitrans</i>	<i>T-Iso</i>
20:4n-6	9.2 \pm 3.3	3.1 \pm 0.7	4.6 \pm 0.6	1.2 \pm 0.2
20:5n-3	14.0 \pm 1.4	0.4 \pm 0.1	12.6 \pm 2.1	2.0 \pm 1.3
22:6n-3	1.3 \pm 0.1	8.4 \pm 0.4	5.1 \pm 1.0	14.1 \pm 1.4

Table 3: Percent composition of the main long-chain polyunsaturated fatty acids in polar lipids of clam mantle collected at 7 dpi. Clams were fed *Chaetoceros calcitrans* or *T-Isochrysis aff. galbana*, clone Tahitian (*T-Iso*) and injected with filtered seawater (control) or *Vibrio tapetis*. Clams injected with *V. tapetis* were either BRD- (no clinical sign of infection) or BRD+ (visible brown ring). Values are mean \pm standard deviations, expressed as percentage of total fatty acids.

Fatty acid	<i>C. calcitrans</i>		<i>T-Iso</i>		
	Control	BRD+	Control	BRD-	BRD+
20:4n-6	5.4 \pm 0.5	5.4 \pm 0.4	5.0 \pm 0.4	5.0 \pm 0.8	4.9 \pm 0.2
20:5n-3	7.4 \pm 0.5	7.2 \pm 0.4	5.7 \pm 0.3	5.3 \pm 0.5	5.8 \pm 0.1
22:6n-3	19.5 \pm 0.8	19.8 \pm 0.6	21.6 \pm 1.5	20.6 \pm 1.0	21.0 \pm 0.7
Unsaturation index	277 \pm 3.4	274 \pm 4.6	282 \pm 8.6	277 \pm 0.7	282 \pm 4.2

Table 4: Summary of PERMANOVA conducted on different sampling times (significant effects are in bold).

Times	Explanatory variables	PERMANOVA statistics		
		r ²	F	p-value
2, 7 and 30 dpi	Diet	0.01	0.54	0.64
	Treatment	0.30	2.19	0.03
	Diet x Treatment	0.20	1.78	0.09
2 and 7 dpi	Diet	0.04	1.7	0.16
	Treatment	0.36	3.89	<0.01
	Diet x Treatment	0.28	4.08	<0.01
2 dpi	Diet	0.03	0.65	0.53
	injection x BRD status	0.29	5.8	0.01
	diet x injection x BRD status	0.14	2.86	0.07
7 dpi	Diet	0.07	1.24	0.32
	injection x BRD status	0.3	2.68	0.03
	diet x injection x BRD status	0.02	0.36	0.81
30 dpi	alga	0.06	0.51	0.66
	injection x BRD status	0.03	0.23	0.92
	diet x injection x BRD status	0.06	0.52	0.63

List of figures

Figure 1: Principal component analysis ordination biplot representing the effect of treatment on biochemical parameters of clams (lines) at 2 and 7 days post-injection (dpi). Clams were injected with filtered seawater (control) or with its pathogen *Vibrio tapetis*. Clams injected with *V. tapetis* were either BRD- (no clinical sign of infection) or BRD+ (visible brown ring). white symbols: control; grey symbols: BRD-; black symbols: BRD+. Triangles: 2 dpi; circles: 7 dpi. Abbreviations: t-SOD, total superoxide dismutase; Cu/Zn-SOD, Cu/Zn superoxide dismutase; Mn-SOD, Mn superoxide dismutase; CAT, catalase; t-GPx, total glutathion peroxidase; Se-GPx, selenium-dependant glutathione peroxidase; GR, glutathion reductase; GST, glutathione-S-transferase; TrxR, thioredoxin reductase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; PO, phenoloxidase; HK, hexokinase ; PK, pyruvate kinase; CS, citrate synthase.

Figure 2: Biochemical parameters of clams at 2 and 7 days post-injection (dpi) with filtered seawater (control, white bars) or with *V. tapetis*. Clams injected with *V. tapetis* were either BRD- (no clinical sign of infection, grey bars) or BRD+ (visible brown ring, black bars). Abbreviations: t-SOD, total superoxide dismutase; Cu/Zn SOD; Cu/Zn superoxide dismutase; CAT, catalase; Se-GPx, selenium dependant glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GST, glutathione-S-tranferase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; PO, phenoloxidase. Specific enzymes activities are represented as mean \pm standard deviation (SD). Letters indicate significant differences.

Figure 1

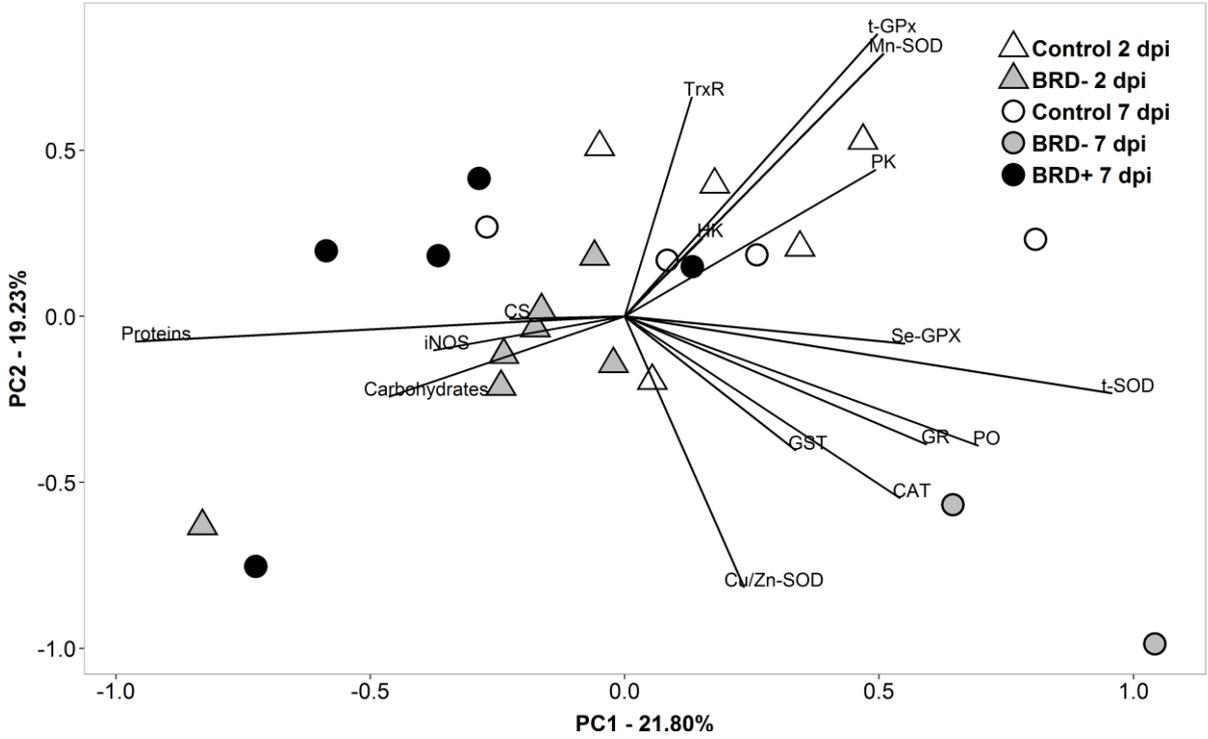
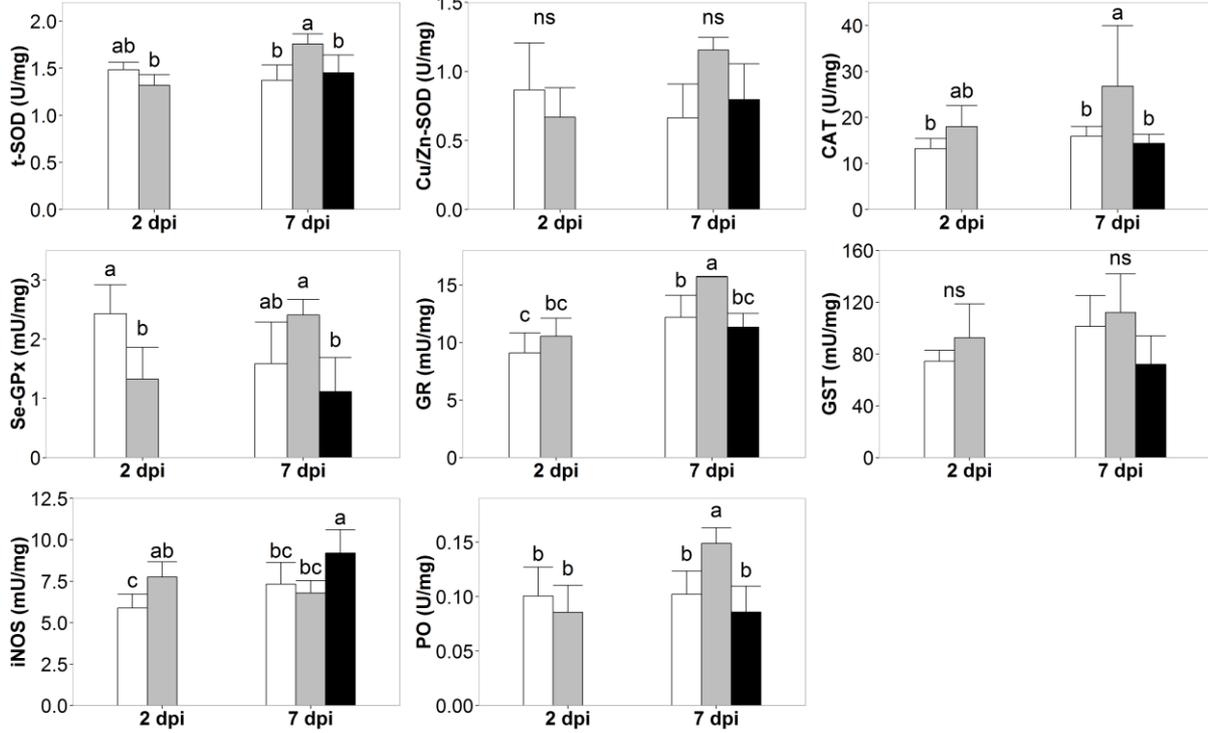


Figure 2



Appendix 1: Inducible Nitric Oxide Synthase activity assay

Nitric Oxide Synthases (NOS) are NADPH-dependant enzymes that convert L-Arginine (L-ARG) into L-Citrulline (L-CIT) in presence of its co-factors tetrahydrobiopterin (BH_4). FAD (Calderon-Cortes et al., 2006). In mammalian, three iso-enzymes of NOS are known: the neuronal and constitutive NOS (nNOS or NOS I), the endothelial and constitutive NOS (eNOS or NOS III) and the inducible NOS originally found in macrophages (iNOS or NOS II). Constitutive forms are calmodulin/ Ca^{2+} dependant while iNOS is calmodulin/ Ca^{2+} independent (Knowles and Moncada, 1994). Additionally, iNOS was characterized in haemocytes of the snail *Viviparus ater* and the oyster *Crassostrea virginica* (Conte and Ottaviani, 1995; Villamil et al., 2007).

Numerous studies examining iNOS immune role in bivalves used the Griess Reagent protocol which measures breakdown products of NO (nitrates and nitrites). Thus, this method is not considered as directly evaluating iNOS activity. The most sensitive method for NOS activity determination is based on the monitoring of radiolabelled L-ARG (Knowles and Moncada, 1994). However, this method is time-consuming because using chromatographic separation of L-CIT from L-ARG (Knipp and Vasak, 2000).

Here, we propose a protocol for determination of iNOS activity which is non-radioactive and directly measures the enzyme's product, L-CIT. Our method is based on (Knipp and Vasak, 2000) and relies on L-citrulline formation detection.

Briefly, 55 μ L of protein supernatants were incubated during 30 minutes at 37°C with 5 μ L of assay buffer: Tris buffer (20 mM pH 7.4), NADPH (1 mM), L-Arginine (1 mM), 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (10 μ M), FAD⁺ (5 μ M). As iNOS is Ca^{2+} /Calmodulin independent, contrarily to constitutive NOS, these reagents were not added to reaction buffer (Cho et al., 1992; Gross, 1996). Samples were also incubated with the same assay buffer containing L-NMMA (200 μ M), a specific inhibitor of NOS, in order to assess specifically NOS activity (Knowles and Moncada, 1994). Blanks were run (PBS buffer instead of samples) and iNOS from mouse was used as a standard for range curve (Figure 1). The reactions were stopped by addition of 200 μ L of the colour developing reagent (COLDER): 2. 3-butanedione monoxime (20 mM), thiosemicarbazide (0.5 mM), phosphoric acid (2.25 M), sulfuric acid (4.5

M), ammonium iron (III) sulfate dodecahydrate (1.5 mM). Then, the microplate was immediately sealed with foil and placed on a preheated aluminium plate in an oven at 95°C for 15 minutes for colour development (Figure 2). After colour development, the microplate was removed from the oven and allowed to cool down for 10 minutes at room temperature. Absorbances were read at 530 nm. Activities were calculated for each sample by subtracting blank values and activities obtained with L-NMMA inhibition, and expressed as U/mg total protein (1 U corresponding to the amount of enzyme producing 1 μmole of L-citrulline per minute in the above conditions).

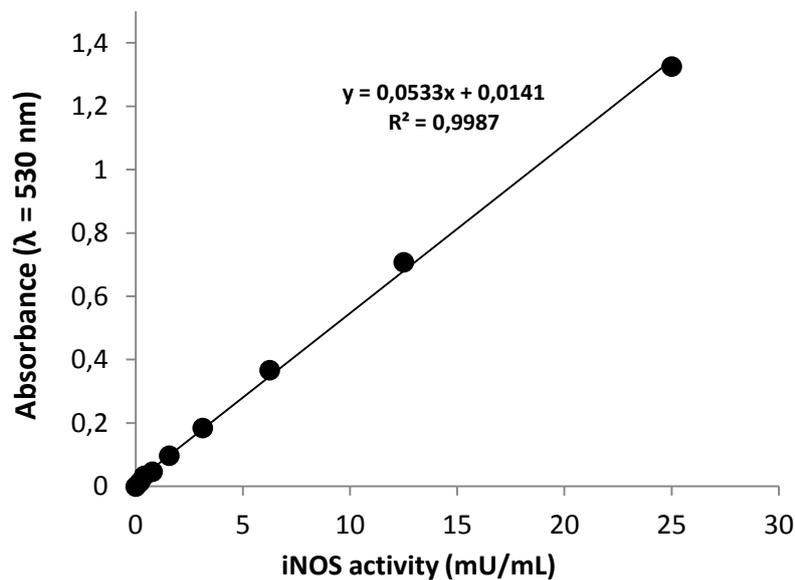


Figure 1: Example of standard curve obtained with iNOS from mouse in this protocol conditions.

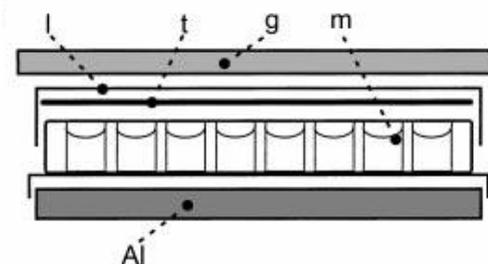


Figure 2: Setup for the color development – from Knipp & Vasak. 2000.

Abbreviations: m = microplate; l = lid of the microplate; t = thermoresistant sealing tape (foil tape); Al = preheated aluminum plate (at 95°C); g = preheated glass plate (at 95°C).

References

- Calderon-Cortes, E., Clemente-Guerrero, M., Sierra-Campos, E., Cortes-Rojo, C., Gaona-Zamudio, F.J., Villalobos-Molina, R., Saavedra-Molina, A., 2006. Functional characterization of brain mitochondrial nitric oxide synthase during hypertension and aging. *Amino Acids* 30, 73–80. doi:10.1007/s00726-005-0213-x
- Cho, H., Xie, Q., Calaycay, J., Mumford, R., Swiderek, K., Lee, T., Nathan, C., 1992. Calmodulin Is a Subunit of Nitric-Oxide Synthase from Macrophages. *J. Exp. Med.* 176, 599–604. doi:10.1084/jem.176.2.599
- Conte, A., Ottaviani, E., 1995. Nitric-Oxide Synthase Activity in Molluscan Hemocytes. *Febs Lett.* 365, 120–124. doi:10.1016/0014-5793(95)00439-G
- Gross, S.S., 1996. Microtiter plate assay for determining kinetics of nitric oxide synthesis. *Nitric Oxide Pt - Sources Detect. No No Synthase* 268, 159–168.
- Knipp, M., Vasak, M., 2000. A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline. *Anal. Biochem.* 286, 257–264. doi:10.1006/abio.2000.4805
- Knowles, R., Moncada, S., 1994. Nitric-Oxide Synthases in Mammals. *Biochem. J.* 298, 249–258.
- Villamil, L., Gomez-Leon, J., Gomez-Chiarri, M., 2007. Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 968–977. doi:10.1016/j.dci.2007.01.006

Appendix 2: Summaries of means \pm standard deviation and ANOVA for biochemical parameters of clams at 2 and 7 days post-injection (dpi) with filtered seawater (control) or with *V. tapetis*. Clams injected with *V. tapetis* were either BRD- (no clinical sign of infection) or BRD+ (visible brown ring). Abbreviations: t-SOD, total superoxide dismutase; Cu/Zn-SOD, Cu/Zn superoxide dismutase; Mn-SOD, Mn superoxide dismutase; CAT, catalase; t-GPx, total glutathion peroxidase; Se-GPx, selenium-dependant glutathione peroxidase; GR, glutathion reductase; GST, glutathione-S-transferase; TrxR, thioredoxin reductase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; PO, phenoloxidase; HK, hexokinase; PK, pyruvate kinase; CS, citrate synthase. Letters indicate significant differences.

Variable	Unit	2 dpi		7 dpi			ANOVA statistics	
		Control	BRD-	Control	BRD-	BRD+	F	p-value
t-SOD	U/mg	1.49 \pm 0.08 ^{ab}	1.32 \pm 0.11 ^b	1.37 \pm 0.16 ^b	1.76 \pm 0.11 ^a	1.45 \pm 0.19 ^b	4.5	<0.01
Cu/Zn-SOD	U/mg	0.87 \pm 0.34	0.67 \pm 0.21	0.67 \pm 0.24	1.15 \pm 0.09	0.80 \pm 0.26	1.73	0.18
Mn-SOD	U/mg	0.61 \pm 0.31	0.65 \pm 0.22	0.75 \pm 0.30	0.60 \pm 0.02	0.60 \pm 0.21	0.46	0.77
CAT	U/mg	13.25 \pm 2.16 ^b	18.05 \pm 4.52 ^{ab}	15.92 \pm 2.14 ^b	26.82 \pm 13.15 ^a	14.37 \pm 2.00 ^b	5.87	<0.01
t-GPx	mU/mg	9.34 \pm 1.05	8.01 \pm 1.38	9.32 \pm 1.59	6.75 \pm 0.77	8.01 \pm 1.59	2.06	0.13
Se-GPx	mU/mg	2.43 \pm 0.49 ^a	1.32 \pm 0.54 ^b	1.59 \pm 0.70 ^{ab}	2.41 \pm 0.26 ^a	1.11 \pm 0.58 ^b	6.76	<0.01
GR	mU/mg	9.09 \pm 1.74 ^c	10.55 \pm 1.56 ^{bc}	12.18 \pm 1.92 ^b	15.69 \pm 0.06 ^a	11.34 \pm 1.20 ^{bc}	8.32	<0.01
GST	mU/mg	74.36 \pm 8.47	92.64 \pm 25.99	101.32 \pm 23.81	112.00 \pm 29.85	72.03 \pm 21.88	3.19	0.03
TrxR	mU/mg	269.23 \pm 72.51	181.62 \pm 48.19	215.80 \pm 100.14	125.76 \pm 47.75	228.50 \pm 91.13	1.96	0.13
iNOS	mU/mg	5.88 \pm 0.84 ^c	7.76 \pm 0.91 ^{ab}	7.32 \pm 1.32 ^{bc}	6.79 \pm 0.75 ^{bc}	9.20 \pm 1.41 ^a	8.43	<0.01
PO	I.U.	0.10 \pm 0.03 ^b	0.09 \pm 0.02 ^b	0.10 \pm 0.02 ^b	0.15 \pm 0.01 ^a	0.09 \pm 0.02 ^b	3.23	0.03
HK	U/mg	6.05 \pm 1.34	6.00 \pm 0.68	6.77 \pm 0.71	6.91 \pm 2.16	7.29 \pm 0.97	1.99	0.13
PK	mU/mg	26.33 \pm 3.69	22.93 \pm 3.16	26.41 \pm 1.52	27.62 \pm 3.32	26.75 \pm 2.76	2.18	0.10
CS	mU/mg	31.92 \pm 7.27	43.92 \pm 21.90	54.24 \pm 15.05	47.53 \pm 1.19	58.47 \pm 12.41	2.21	0.16
Proteins	mg/g WW	21.80 \pm 0.81 ^{ab}	21.13 \pm 1.43 ^{ab}	21.0 \pm 0.41 ^{ab}	16.71 \pm 3.27 ^b	23.91 \pm 0.72 ^a	3.57	0.02
Carbohydrates	mg/g WW	13.71 \pm 5.04	17.48 \pm 5.13	15.40 \pm 4.85	11.01 \pm 5.21	18.32 \pm 4.74	1.49	0.24

3. Conclusions de l'expérimentation 2 – étude par pools

La composition en acides gras polaires insaturés (AGPI) des lipides neutres des glandes digestives des palourdes reflétait bien les signatures typiques en AGPI des deux algues utilisées à savoir, *T-Isochrysis aff. galbana*, clone Tahitian (*T-Iso*) et *Chaetoceros calcitrans*. Cependant, les lipides polaires du manteau de *R. philippinarum* ont été nettement moins influencés par la composition en AGPI des deux régimes monoalgaux. Ainsi, on peut penser qu'un phénomène d'incorporation sélective a eu lieu dans les lipides polaires de cet organe ce qui a conduit à des compositions en AGPI quasi-similaires des lipides polaires dans le manteau des palourdes, quelle que soit l'algue. Cela contribue ainsi à expliquer que les activités enzymatiques liées à l'immunité, au système antioxydant et au métabolisme énergétique n'aient pas été influencées par le régime algal.

Dans cette étude, le point le plus marquant réside dans le fait qu'une réponse de la palourde exposée à *V. tapetis* a pu être observée à deux et sept jours post-injection en fonction du développement de la maladie chez ces individus.

La réponse « précoce » observée à deux jours chez les animaux injectés avec *V. tapetis* mais exempts de signes cliniques de la MAB (MAB-) a été associée à une diminution des activités antioxydantes (t-SOD, Cu/Zn-SOD, Se-GPx), à l'exception d'une tendance à l'augmentation de la CAT. La diminution presque générale des activités antioxydantes chez ces animaux nous amène à penser qu'une accumulation des ERO a lieu dans le manteau des palourdes. Par ailleurs, à deux jours post-injection, l'activité iNOS est plus importante chez les MAB- par rapport aux témoins, ce qui résulterait en une production de NO et donc d'ERA. Ensemble, ces résultats témoignent d'une réponse immunitaire précoce visant à détruire le pathogène via la production/accumulation d'ERO et d'ERA.

La réponse « tardive » visible à sept jours post-injection a été associée à deux sous-types de réponse dépendant du développement de la MAB chez les animaux. Ainsi, chez les animaux restés visiblement sains (MAB-) à sept jours post-injection, la résistance à l'apparition des signes cliniques de la MAB a été associée à une amélioration générale des activités antioxydantes (t-SOD, Cu/Zn-SOD, CAT, GR). Cette augmentation des activités antioxydantes implique que les MAB- détoxifient les ERO et les ERA efficacement en

comparaison avec les animaux ayant développé un anneau brun (MAB+). **L'état de résistance des MAB- a également été caractérisé par l'augmentation de l'activité de la PO.**

Par ailleurs, chez les MAB+, cette réponse « tardive » à sept jours post-injection est caractérisée par une diminution de l'activité GST et de la Se-GPx et à l'augmentation de l'activité iNOS. Cette diminution des activités antioxydantes concomitante avec la hausse de l'activité iNOS pourrait entraîner une accumulation des ERO et ERA dans le manteau des BRD+ et conduire à un état de stress oxydatif/nitrosatif. **Cependant, les indices d'insaturation des lipides polaires du manteau étaient similaires chez les témoins, les MAB- et les MAB+, ce qui suggère que la réduction des activités GST et antioxydantes n'a pas été suffisamment forte pour induire une augmentation des ERO conduisant à une dégradation des lipides membranaires.**

Discussion générale

La maladie de l'anneau brun (MAB) doit être abordée comme la résultante d'une interaction complexe entre *R. philippinarum*, *V. tapetis* et l'environnement. Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis d'étudier, grâce à des expérimentations *in vivo*, l'influence de quelques facteurs qualifiés d'internes, associés à la susceptibilité/résistance de l'hôte et à la virulence du pathogène et de quelques facteurs qualifiés d'« externes » associés à l'environnement sur le développement de la MAB (Figure 37).

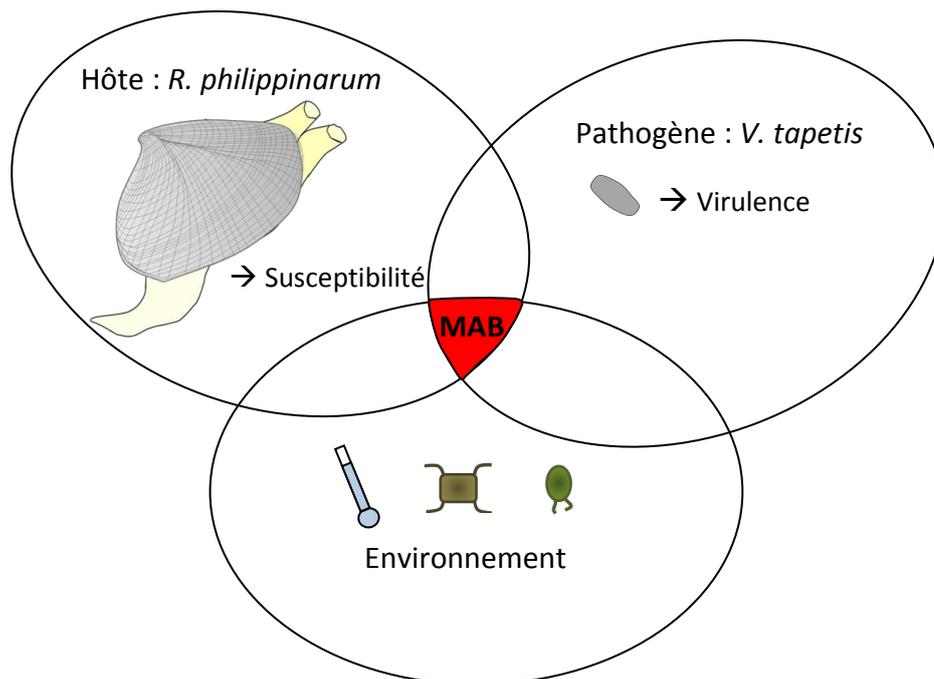


Figure 37 : Représentation schématique de l'interaction hôte-pathogène-environnement dans le cadre de la maladie de l'anneau brun.

Dans un souci de clarté, cette discussion s'articule autour de l'influence de chacun de ces facteurs, en gardant toujours à l'esprit que ceux-ci sont interconnectés. Ainsi, la première et la seconde partie traiteront respectivement de l'influence de quelques facteurs internes et externes étudiés au cours de cette thèse. Dans ces deux premières parties, les termes pathogénicité et virulence sont employés selon les définitions de Sparling (1983) et Casadevall & Pirofski (1999), *i.e.*, comme la capacité du microorganisme à induire des dommages chez l'hôte et comme un degré de pathogénicité respectivement. La dernière partie de cette discussion se focalisera sur la réponse métabolique de *R. philippinarum* lors d'une infection expérimentale à *V. tapetis*.

1. La maladie de l'anneau brun : influence de quelques facteurs internes

1.1. La virulence de *Vibrio tapetis* : comparaison entre deux souches

L'expérimentation 1 a permis de montrer qu'à la température de 15 °C¹⁶, la virulence de *V. tapetis* souche CECT4600 est accrue en comparaison à la souche LP2. En effet, la prévalence et l'intensité de la MAB des palourdes infectées par la souche CECT4600^T ont été augmentées de manière significative en comparaison à la souche LP2 à 15 °C.

Cette expérimentation était la première comparant l'effet de deux souches de *V. tapetis* sur le développement de la MAB suite à une injection dans la cavité extrapalléale périphérique de la palourde. En effet, si des tests de pathogénicité et de virulence de diverses souches de *V. tapetis* ont été effectués suite à des expositions *in vivo*, ces études ont toujours utilisé les méthodes d'infection expérimentale par injection dans la cavité palléale ou dans le muscle adducteur (Choquet, 2004). Ainsi, il a été montré qu'une injection des souches CECT4600^T et LP2 dans le muscle adducteur de *R. philippinarum* provoquait une mortalité des animaux atteignant 65 % à 7 jours post-injection (Choquet, 2004). Cela a permis de démontrer le caractère pathogène de ces deux souches chez la palourde japonaise. De plus, après une injection dans la cavité palléale de ces deux souches, on observe une prévalence de la MAB bien plus faible dans le cas de souche LP2 (environ 15 %) que dans celui de la souche CECT4600^T (environ 50 %) (Choquet, 2004; Paillard, 2004a). Cela a mis en évidence pour la première fois la différence de virulence entre les deux souches de *V. tapetis* envers *R. philippinarum*. Dans le cas d'une injection extrapalléale, *V. tapetis* est directement « placé » au niveau du site infectieux de la MAB, les étapes de colonisation et de dégradation de la lame périostracale n'ont alors pas lieu. Ainsi, nos résultats permettent d'aller un peu plus loin et de supposer que **la différence de virulence des deux souches de *V. tapetis* serait associée aux premières étapes de l'infection : entrée dans l'organisme, colonisation et dégradation de la lame périostracale, colonisation des fluides extrapalléaux.** En d'autres termes, *V. tapetis* souche LP2 ne posséderait pas nécessairement les facteurs de virulence associés à la colonisation de la lame

¹⁶ La température optimale pour le développement de la MAB se situe autour de 14 °C (Paillard et al., 2004)

péριοstracale, à sa dégradation ainsi qu'à la colonisation des fluides extrapalléaux ou, si elle les possède, ces facteurs pourraient être moins efficaces ou en quantité moindre que ceux de la souche CECT4600. En effet, une fois que les deux souches ont pénétré les tissus et donc la circulation hémolympatique, elles entraînent toutes les deux une mort rapide de l'hôte comme observé dans le cas d'une injection dans le muscle adducteur. Par ailleurs, les effets cytotoxiques des souches CECT4600^T et LP2 ont été confirmés par des expositions *in vitro* aux hémocytes provenant de l'hémolymphe de *R. philippinarum* (Choquet et al., 2003). Ces essais ont mis en évidence une perte d'adhérence des hémocytes plus importante dans le cas de CECT4600^T (Choquet et al., 2003). **On pourrait donc supposer que, même au sein des fluides extrapalléaux, contenant également des hémocytes, les deux souches expriment des virulences contrastées. Cette différence de pathogénicité vis-à-vis des cellules immunitaires entre les souches LP2 et CECT4600 contribuerait à expliquer la différence de virulence observée dans le cadre de l'injection dans la cavité extrapalléale périphérique menée lors de l'expérimentation 1.**

Par ailleurs, l'expérimentation 1 était également la première comparant l'effet de deux souches de *V. tapetis* sur l'activité d'enzymes impliquées dans le système immunitaire (PO) et antioxydant (SOD) de *R. philippinarum* suite à une injection dans la cavité extrapalléale périphérique. Cependant, les activités PO et SOD dans le manteau et l'hémolymphe de *R. philippinarum* n'étaient pas significativement différentes quelle que soit la souche de *V. tapetis* considérée pour les animaux acclimatés à 15 °C, 3 et 30 jours post-injection. Cependant, des résultats complémentaires à cette étude ont montré une augmentation de l'activité de ces deux enzymes dans le manteau des animaux 36 h post-injection quelle que soit la souche considérée, pouvant traduire une réponse précoce au pathogène (Le Bris et al., 2015). Puis, à 3 jours post-injection, l'activité de ces enzymes semblait être diminuée dans le manteau des animaux injectés avec la souche CECT4600 par rapport à ceux injectés avec la souche LP2 (Le Bris et al., 2015). **Cette modulation des activités PO et SOD dans le manteau pourrait être associée à la différence de virulence des deux souches observée suite à l'étude des prévalences et intensités de la MAB.** De plus, si quelques tendances ont été ressorties quant aux activités PO et SOD dans l'hémolymphe 30 jours post-injection, la variabilité interindividuelle associée aux mesures effectuées dans ce tissu n'a pas permis de conclure avec certitude quant à de possibles effets des souches à 15

°C. Les résultats issus de l'expérimentation 1 montrent donc l'importance du choix du tissu étudié mais également des temps de prélèvement dans une telle expérimentation puisque les modulations de marqueurs enzymatiques peuvent être fugaces. Leur dosage apporte des éléments d'information quant à la capacité de défense de l'hôte *dans un tissu et à un instant précis*. De ce fait, l'interprétation de tels résultats n'est pas chose aisée étant donné la complexité du système étudié.

1.2. La maladie de l'anneau brun : une histoire de compromis énergétiques chez l'hôte ?

1.2.1. Energie mobilisée pour la réponse immunitaire

Lors des expérimentations 1 et 2, les indices de conditions (IC) des animaux n'ont pas été affectés par le développement de la MAB (qu'il y ait apport de nourriture exp.2 ou non exp.1). Si les premières observations de mortalité massive causées par la MAB ont été associées à la diminution de l'indice de condition (IC) des palourdes (Paillard, 1992; Flye-Sainte-Marie et al., 2007), il a également été montré que seules les palourdes sévèrement atteintes (stades ≥ 4)¹⁷ présentaient des pertes de poids et donc des baisses d'IC conséquentes, qu'elles soient nourries ou non (Flye-Sainte-Marie et al., 2007, 2009a). Or, les intensités de maladie obtenues pour l'expérimentation 1 atteignaient la valeur maximale de 4 et les indices de dépôt de conchioline calculés¹⁸ lors de l'expérimentation 2 correspondaient à des valeurs en deçà des valeurs obtenues lors de l'expérimentation 1. **Ainsi, si les IC n'ont pas été impactés lors de nos challenges infectieux, sans doute est-ce dû aux faibles intensités de la MAB observées chez *R. philippinarum* et ce, indépendamment de la présence de nourriture.**

Les paramètres hématocytaires évalués lors de l'expérimentation 2 n'ont pas été affectés par l'injection extrapalléale périphérique de *V. tapetis*. C'est la première fois qu'un tel résultat est obtenu puisque ces paramètres ont toujours été mesurés suite à des injections dans la cavité palléale, dans le muscle adducteur ou encore dans la cavité extrapalléale centrale (Oubella et al., 1993; Paillard, 2004b; Allam et al., 2006). La

¹⁷ Stades de dépôt de conchioline chez *R. philippinarum* selon la classification proposée par Paillard & Maes (1994)

¹⁸ Indices calculés sur la base d'un rapport considérant la surface coquillère recouverte d'un dépôt de conchioline et la surface coquillère totale de l'individu (cf Matériel et méthodes)

modulation de certains de ces paramètres (production d'espèces réactives de l'oxygène, phagocytose, concentration en hémocytes circulants totale) dans l'hémolymphe ainsi que dans les fluides extrapalléaux a été observée suite à différents types d'injection (Allam et al., 2002; Choquet, 2004; Allam et al., 2006). **Ainsi, le fait que ces paramètres n'aient pas évolué au cours de l'expérimentation 2 chez les animaux injectés par *V. tapetis* nous amène à penser que leur régulation dans les fluides corporels serait dépendante du site d'injection. Il serait donc intéressant de mesurer ces paramètres à la fois dans l'hémolymphe et dans les fluides extrapalléaux afin de confirmer cette hypothèse dans le cadre d'une injection extrapalléale périphérique.**

Par ailleurs, les paramètres hémocytaires sont particulièrement affectés par l'indice de condition de l'animal, la pression infectieuse du milieu, les conditions environnementales ou encore la résistance de l'animal à la maladie (Paillard, 1992; Soudant et al., 2004; Delaporte et al., 2007; Flye-Sainte-Marie et al., 2009b). Ainsi, s'il est vrai que les hémocytes sont généralement considérés comme les cellules permettant de se défendre contre les attaques extérieures, ils intègrent également toutes les modifications externes. Dans ce cas, les paramètres que nous observons peuvent être la résultante d'effets multiples. Ainsi, on peut penser que si le stress externe n'est pas suffisamment « fort », son influence sur les paramètres hémocytaires pourrait alors être masquée par la variabilité interindividuelle (« bruit de fond »). **Cette propriété intégrative des hémocytes pourrait donc contribuer à expliquer que les paramètres hémocytaires mesurés lors de l'expérimentation 2 n'aient pas été influencés par l'infection par *V. tapetis*.**

Lors de l'expérimentation 2, les indices de réparation coquillère étaient également similaires chez les animaux infectés par *V. tapetis* et les témoins. De plus, entre 14 et 30 jours post-injection, les animaux avaient presque entièrement réparé leur coquille. Une telle réparation coquillère n'a que très rarement été observée suite à des infections expérimentales par *V. tapetis*. En fait, de la même manière que pour les paramètres hémocytaires, ce processus de réparation coquillère est la résultante d'un certain nombre de facteurs externes comme la présence de nourriture (Plana et al., 1996), et de facteurs internes tels que l'indice de condition, le stade de dépôt de conchioline, la charge bactérienne ou encore la résistance de la palourde à la MAB (Paillard et al., 2014; Soudant et al., 2004; Trinkler et al., 2010). Pour notre étude, les palourdes ont été récoltées à Marennes

à la fin du printemps 2015, ce qui correspond à une zone et à une période associées à de faibles prévalences de la MAB (Paillard and Maes, 1994; Soudant et al., 2004). De plus, ces palourdes ont été nourries *ad libitum* durant l'expérimentation, ce qui a été associé à une activation du processus de réparation coquillère (Plana et al., 1996). Par ailleurs, ces résultats ne peuvent *a priori* pas être associés à une faible pression infectieuse du milieu étant donné la forte concentration de *V. tapetis* qui a été injectée dans les animaux. Finalement, la réparation *quasi*-complète de ces animaux nous amène à les considérer comme « convalescents » ou « guéris » (Paillard, 2004a).

Suite à tous ces constats, nous émettons l'hypothèse suivante : les animaux étaient initialement en « bonne santé », ont été nourris de façon optimale, ce qui a été associé à une plus grande résistance vis-à-vis du développement des signes cliniques de la MAB (stades de maladie relativement bas et la réparation totale est observée dès 14 jours post-injection).

Les études menées par Flye-Sainte-Marie et al. (2007, 2009a) ont démontré qu'un compromis énergétique s'opérait chez *R. philippinarum* lorsque celle-ci était fortement infectée par *V. tapetis*. Ce compromis a été caractérisé par une augmentation des coûts énergétiques associés à la maintenance de l'organisme et serait dû à la mobilisation de l'énergie pour la réponse immunitaire et les processus de réparation coquillère (Flye-Sainte-Marie et al., 2009a). Nous avons vu lors l'expérimentation 2 que, ni les indices de condition, ni les paramètres immunitaires, ni la réparation coquillère n'étaient impactés par le développement de la MAB et que nos animaux étaient finalement guéris. **Ainsi, dans le cadre de cette étude, le développement de la MAB a finalement été limité à des stades de dépôt de conchioline inférieurs à 4, ce qui laisse supposer que les animaux n'ont pas été confrontés à un compromis énergétique croissance vs défense/ réparation. Ces résultats expérimentaux confortent donc la conclusion de Flye-Sainte-Marie et al. (2007) qui supposent qu'en milieu naturel, la palourde japonaise est tolérante aux faibles niveaux de maladie (CDS \leq 4).**

1.2.2. Energie mobilisée dans le processus de reproduction

Lors de l'expérimentation 2, nous avons observé que les palourdes présentaient des stades de gamétogénèse très variables mais qui n'ont pas évolué durant la

l'expérimentation. En effet, aussi bien les mâles que les femelles ont présenté des stades de maturité sexuelle en proportions similaires au cours du temps, et ce, quelles que soient les conditions de nourriture et d'injection. Nous avons fixé la température de l'eau et de l'air ambiant à 13 °C afin d'éviter tout phénomène de ponte. **Nous pensons que cette température fixée à 13 °C a également contribué à « stopper » la maturation sexuelle des animaux. Cela nous a donc permis d'évaluer l'impact de la maturité sexuelle des animaux sur le développement de la MAB, sans avoir le biais d'une influence de la MAB sur les processus de reproduction des palourdes.**

Lors de cette expérimentation, nous avons finalement montré que les animaux les plus matures sexuellement¹⁹ présentaient des indices de dépôt de conchioline nettement supérieurs à ceux qui étaient moins matures. Ainsi, le statut de reproduction des palourdes infectées par *V. tapetis* a eu un impact certain sur l'intensité de la maladie, visible à 30 jpi. Cela semblerait indiquer que les palourdes infectées par *V. tapetis*, il existe un compromis énergétique défense vs reproduction entre d'une part, l'énergie allouée à la réponse immunitaire qui vise à circonscrire l'infection et, d'autre part, l'énergie allouée au processus de reproduction. **C'est la première fois que le rôle de la maturité gonadique est mis en évidence dans le cadre de la maladie de l'anneau brun.** De tels compromis énergétiques ont déjà été observés chez d'autres espèces d'invertébrés marins comme c'est le cas pour la vibriose de l'ormeau *Haliotis tuberculata* (Travers et al., 2008, 2009) ou encore les épisodes de mortalité massive de l'huître *Crassostrea gigas* (Ernande et al., 2004; Delaporte et al., 2007; Huvet et al., 2010; Wendling and Wegner, 2013).

Cependant, les paramètres hématocytaires et la réparation coquillière n'ont pas été influencés par les stades de maturité sexuelle en relation avec le développement de la MAB lors de cette expérimentation. De prime abord, ces résultats semblent être en désaccord avec ceux obtenus dans le cas de la vibriose de l'ormeau et des épisodes de mortalité massive de l'huître *C. gigas*. En effet, ces compromis énergétiques ont été caractérisés par une baisse générale des paramètres hématocytaires au moment de la ponte chez *C. gigas* (Wendling and Wegner, 2013) et au moment de la ponte mais également entre pontes partielles chez *H. tuberculata* (Travers et al., 2009). Comme nous l'avons expliqué

¹⁹ Stades 3 et 4 de la classification des stades de maturité sexuelle chez *R. philippinarum* selon Drummond et al., 2006

auparavant, les paramètres hématocytaires et la réparation coquillière sont particulièrement dépendants des facteurs externes mais également de facteurs internes de l'animal. **Dans notre cas, nous pensons que la nourriture apportée aux animaux associée à un bon état de santé initial de ceux-ci aura fortement contribué à fournir l'énergie nécessaire à la réponse immunitaire contre *V. tapetis* sans qu'il n'y ait pour autant un coût énergétique associé.**

Par ailleurs, les principaux effets immunitaires des compromis énergétiques observés chez l'ormeau et l'huitre, ont été associés à des stades de maturité particulièrement avancés, notamment au moment des pontes. Dans notre cas, nous avons « arrêté » le processus de maturation sexuelle et n'avons jamais observé de ponte, ce qui a été confirmé par des IC similaires durant l'expérimentation. Il est probable que **les effets immunitaires associés au compromis énergétique défense vs reproduction n'ont pas pu être observés dans ce travail du fait de stades de maturité trop peu avancés, et notamment de l'absence de ponte** Cette idée rejoint celle évoquée précédemment concernant la propriété intégrative des hémocytes, en considérant ici la maturation sexuelle comme un « stresser interne » qui ne serait pas suffisamment « puissant » pour induire des modifications des paramètres hématocytaires. Plusieurs études renforçant cette hypothèse ont montré que les paramètres hématocytaires des bivalves étaient particulièrement influencés lors des périodes de ponte (Pipe and Coles, 1995; Soudant et al., 2004; Flye-Sainte-Marie et al., 2009b). Cependant, les études de terrain de suivi saisonnier de la MAB ainsi que de la perkinsose chez *R. philippinarum* n'ont pas mis en évidence un lien entre les paramètres hématocytaires et les intensités de la MAB, car celles-ci étaient trop faibles (Soudant et al., 2004; Flye-Sainte-Marie et al., 2009b).

Au final, une étude complémentaire en milieu contrôlé prenant en compte tous les stades associés au processus de reproduction, allant des premiers stades de la gamétogénèse jusqu'à la ponte et la régénération des tissus gonadiques, serait nécessaire pour caractériser plus précisément les compromis énergétiques effectués par *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis*.

2. La maladie de l'anneau brun : influence de facteurs externes

Note préliminaire : cas des témoins expérimentaux

Une des difficultés liées aux expérimentations menées à partir de matériel vivant provenant du milieu naturel réside dans le contrôle de l'état sanitaire des animaux dès leur arrivée au laboratoire. Nous avons vu au cours de cette thèse qu'une partie des individus témoins des différentes expérimentations présentaient toujours des signes cliniques de la MAB. **En effet, lors des expérimentations 1 et 2, les prévalences de la MAB ont atteint 40 à 60 % pour l'expérimentation 1 et 30 % pour l'expérimentation 2 chez les individus témoins.** Pour les expérimentations 1 et 2, les palourdes ont été récoltées respectivement à l'île Tudy et à Marennes, des zones où la prévalence de la MAB est considérée comme faible (Soudant et al., 2004; Jeffroy, 2011). Même si ces animaux ne présentaient aucun signe clinique de la maladie à leur arrivée au laboratoire, le développement de la MAB a toutefois eu lieu. Ce phénomène peut d'abord s'expliquer par une prévalence non-nulle sur les côtes françaises atlantique-nord durant toute l'année (Paillard et al., 1997; Soudant et al., 2004; Flye-Sainte-Marie et al., 2009b). Par exemple, la prévalence moyenne en 2004 dans le golfe du Morbihan était d'environ 10 % et atteignait son niveau maximal autour de 20 % au mois de décembre (Flye-Sainte-Marie et al., 2009b). Globalement, une prévalence maximale de 30 % peut être observée mais elle dépend du site et de la saison considérés (Paillard, 2004b). Cette prévalence non nulle au cours de l'année indique que les facteurs environnementaux externes des côtes atlantiques-nord sont presque toujours favorables au développement de la MAB, même si les périodes hivernales sont les plus propices à celui-ci. Plusieurs programmes de sélection ont donc été mis en œuvre dans le but d'enrayer la maladie dans les concessions vénériques et ont permis d'identifier des familles plus résistantes à la MAB mais également des zones d'élevage moins sensibles (Soudant et al., 2004; Jeffroy, 2011). En dépit de ces efforts, il n'existe à l'heure actuelle aucune zone épargnée par la présence de la MAB en France (comm. pers. Jean-François Auvray, SATMAR).

Les prévalences obtenues pour la première expérimentation sont bien plus fortes que celles observées en milieu naturel et peuvent s'expliquer par les conditions expérimentales. Pour cette expérimentation, les palourdes ont été placées dans des bacs

sans renouvellement de l'eau²⁰ et sans apport de nourriture dans l'optique de créer des conditions stressantes permettant un développement accru de la maladie chez les individus injectés avec *V. tapetis*. Par ailleurs, ces palourdes ont été récoltées pendant l'automne (2012), une période précédant les mortalités hivernales et pré-printannières associées à *V. tapetis*, qui pourrait donc être considérée comme une période d'incubation de la maladie et expliquerait donc le développement de la maladie en milieu contrôlé (Paillard, 2004a). **Nous pouvons donc supposer que ces fortes prévalences sont à la fois la conséquence d'un statut immunitaire initial favorable au développement de la MAB et des conditions stressantes imposées par le protocole expérimental utilisé.**

Concernant l'expérimentation 2, les prévalences observées chez les animaux témoins étaient plus faibles que celles de la première expérimentation et correspondent aux prévalences maximales retrouvées sur le terrain. Les palourdes utilisées pour cette expérimentation avaient été récoltées en mai 2015, une période associée à des prévalences MAB plus faibles ainsi qu'à des indices de condition plus élevés chez ces animaux. Par ailleurs, les conditions expérimentales ont été nettement différentes pour cette étude, ceci afin de favoriser au maximum la prise alimentaire et de limiter la prévalence initiale. C'est pourquoi une période de quarantaine a été mise en place dès l'arrivée des animaux pour éviter toute contamination locale. De plus, un renouvellement de l'eau traitée par UV était assuré tous les 2 jours avec un apport de microalgues (cultivées en milieu stérile) non limité et favorisé par la mise en place de systèmes d'air-lift. En dépit de ces mesures, les individus témoins ont tout de même présenté une prévalence de 30 % à l'issue des 30 jours d'infection. **Nous supposons donc que la prévalence finale serait due à la présence de *V. tapetis* qui auront résisté à la période de quarantaine (Bidault et al., in rev; Richard et al., submitted).** Par ailleurs, une étude récente a montré que *V. tapetis* était capable de former des biofilms (Rodrigues et al., 2015) à la surface d'un substrat en verre *in vitro*, tout à fait comparable à sa colonisation de la surface interne des valves (Paillard, 1992). Puisque *V. tapetis* est capable de former de tels biofilms sur la face interne de la coquille de *R. philippinarum* alors cela pourrait notamment le protéger de l'action d'antibiotiques.

²⁰ Un renouvellement de l'eau (traitée par UV) et un nettoyage des bacs étaient effectués lorsque des mortalités étaient constatées.

2.1. La température: un facteur prépondérant dans le développement de la MAB ?

2.1.1. Influence de la température sur la virulence de *V. tapetis*

Les résultats de l'expérimentation 1 ont montré que la prévalence et l'intensité de la MAB chez les animaux injectés avec la souche CECT4600^T étaient plus faibles à 22 °C qu'à 15 °C. Par ailleurs, si la prévalence de la MAB chez les palourdes injectées avec la souche LP2 est également diminuée à 22 °C, l'intensité de la maladie a, quant à elle, été légèrement augmentée. Ces différences de virulence n'avaient jusqu'alors pas été décrites dans le cadre d'une étude *in vivo* chez *R. philippinarum* suite à une injection de *V. tapetis* dans la cavité extrapalléale périphérique en association à deux températures d'acclimatation. Nos résultats impliqueraient une perte de virulence de la souche CECT4600^T à 22 °C tandis que la souche LP2 serait légèrement plus virulente à cette température. Ces conclusions sont cohérentes avec les températures optimales de croissance de ces deux souches puisque celle de LP2 est plus élevée (23 °C) que celle de la souche CECT4600^T (21°C) (Paillard et al., 1997; Paillard, 2004a). Par ailleurs, nous avons précédemment supposé que la souche LP2 ne possédait pas les facteurs de virulence liés à la colonisation de la lame périostracale des palourdes. Cependant, elle possède d'autres facteurs de virulence puisqu'une fois injectée dans le muscle adducteur de *R. philippinarum*, elle entraîne la mort de l'animal de la même manière que la souche CECT4600^T (Choquet, 2004). Il a notamment été montré que leur capacité d'adhésion était 2,5 fois plus élevée à 18 °C par rapport à 14 °C et 6 fois plus élevée par rapport à 7 °C (Choquet, 2004), ainsi on peut penser que les facteurs de virulence associés à l'adhésion de la souche LP2 soient « encore plus activés » à 22 °C, ce qui entrainerait une plus grande virulence par rapport à la souche CECT4600.

2.1.2. Influence de la température sur la réponse immunitaire de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis*

Les résultats de l'expérimentation 1 ont montré que l'augmentation de la température de 14 à 22 °C conduisait à une prévalence, une intensité de la MAB plus faibles et à des stades de réparation coquillères plus élevés. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans le cadre de l'exposition de *R. philippinarum* à *V. tapetis* par injection

palléale en association à une augmentation de la température (Paillard et al., 2004). En effet, dans cette étude, il a été montré que l'augmentation de la température résultait en une activation de la leucine aminopeptidase (LAP) dans l'hémolymphe, une augmentation du pourcentage de granulocytes et du taux de phagocytose (Paillard, 2004a; Paillard et al., 2004). De plus, cette meilleure condition immunitaire de *R. philippinarum* a été associée à une amélioration de la défense face à *V. tapetis*, se traduisant par de plus faibles prévalence et intensité de l'infection aux hautes températures (Paillard et al., 2004). **Ainsi, de manière globale, nos résultats vont dans le sens d'une amélioration générale de la condition immunitaire des animaux à 22 °C résultant en une diminution de la prévalence et de l'intensité de la MAB.**

Par ailleurs, nous avons également constaté que les activités basales (i.e. juste avant injection) de la SOD et de la PO dans le manteau et l'hémolymphe des palourdes étaient plus élevées à 22 °C qu'à 14 °C. Ce résultat est cohérent avec un optimum thermique pour la croissance, la respiration et la filtration de *R. philippinarum* situé entre 20 et 24 °C (Solidoro et al., 2000). Cela signifie que dans cette gamme de températures, la palourde utilise son énergie pour assurer les processus biologiques de maintenance sans qu'un coût supplémentaire lié à la réponse immunitaire face à *V. tapetis* s'ajoute et ne provoque un déséquilibre énergétique. Et puis, l'augmentation de l'activité basale de la SOD à 22 °C est également en accord avec la température optimale déterminée pour cette enzyme chez *R. philippinarum* puisque celle-ci est de 20 °C (Umasuthan et al., 2012).

A 22 °C, une augmentation de l'activité PO et SOD dans le manteau a été observée uniquement chez les individus injectés avec *V. tapetis* et après 30 jours (seulement avec la souche CECT4600 pour la PO et, quelle que soit la souche dans le cas de la SOD). Dans l'hémolymphe, l'activité PO des individus injectés par *V. tapetis* (CECT4600^T et LP2) était augmentée dès 3 jours post-injection et restait supérieure à celle des témoins à 30 jours post-injection. A notre connaissance, il s'agit de la première étude permettant de caractériser l'effet de la température sur la réponse de tels indicateurs biochimiques suite à une infection bactérienne chez un bivalve. Chez *C. gigas*, une étude *in vitro* a montré que la PO présente dans l'hémolymphe possédait une activité bactéricide contre *Vibrio aestuarianus* et *Vibrio splendidus* (Luna-Acosta et al., 2011). De plus, Butt and Raftos (2008) ont mis en évidence le rôle de la PO chez *Saccostrea glomerata* dans le phénomène

d'encapsulation mélanotique du parasite QX, et par conséquent dans la résistance de ces huitres face à cet agent pathogène. **Ainsi, l'élévation de l'activité PO à 22 °C, aussi bien dans l'hémolymphe que dans le manteau, peut se traduire par une surproduction des quinones toxiques pour lutter contre *V. tapetis* mais aussi par une activation du processus de mélanisation des sécrétions coquillères conduisant à sa circonscription. La suractivation de la PO pourrait ainsi contribuer à la diminution de la prévalence et l'intensité de la MAB, y associant le processus de guérison coquillère. Par ailleurs, il semblerait que l'augmentation de la PO dans le manteau à 30 jours post-injection soit reliée à la différence de virulence entre les deux souches puisque cette activité est plus forte chez les animaux infectés par la souche CECT4600^T à 15 °C.**

De plus, l'exposition *in vitro* et *in vivo* à un agent pathogène peut entraîner l'augmentation de la production des ERO dans les hémocytes des bivalves afin de détruire cet agent, ce qui peut résulter en une augmentation des activités antioxydantes (Lambert et al., 2003; Bugge et al., 2007; Costa et al., 2008; Lassudrie et al., 2014). **L'augmentation de l'activité SOD dans le manteau des individus exposés à *V. tapetis* à 30 jours post-injection pourrait faire suite à une augmentation des ERO pour lutter contre la bactérie.**

Cette fois encore, **nous retrouvons des réponses de la SOD et de la PO qui sont temps- et tissus-dépendantes avec des activités dans l'hémolymphe qui augmentent dès 3 jours post-injection alors que dans le manteau, la réponse est observée à 30 jours post-injection à 22 °C.** Cependant, des précautions doivent être prises quant à la généralisation de ces résultats notamment par rapport aux temps de prélèvement choisis. En effet, rien ne nous assure qu'entre les différents temps étudiés (0, 3 et 30 jours post-injection), d'autres modulations de ces activités n'ont pas eu lieu.

En outre, si l'augmentation de la température est associée à un meilleur statut de santé chez l'hôte, elle représente aussi un des facteurs majeurs influençant son statut de reproduction (Mann, 1979; Laruelle, 1999). Or, les défenses immunitaires sont généralement amoindries lors des périodes de pontes comme évoqué précédemment, ce qui peut induire une susceptibilité accrue aux infections chez les bivalves lors de ces périodes. Par exemple, dans le cadre de la vibriose de l'ormeau *H. tuberculata*, une immunodépression marquée par la baisse du taux de phagocytose et de l'activité PO est observée au moment des pontes et

conduit à une plus grande susceptibilité de l'animal face à *Vibrio harveyi* (Travers et al., 2008, 2009). De tels effets ont également été observés chez *C. gigas* suite à l'exposition à différentes souches de vibrions (Wendling and Wegner, 2013).

Au final, si l'on considère l'augmentation de la température des océans de 1 ou 2 °C dans le cadre d'un changement global (Byrne, 2010), une diminution de la prévalence de la MAB chez *R. philippinarum* causée par la souche CECT4600^T pourrait *a priori* être envisagée. Cependant, l'augmentation de la température du milieu pourrait induire une augmentation/diminution de la virulence de certaines souches mais également influencer le statut de reproduction et de santé de l'hôte, ce qui rend tout pronostic quant au devenir de la MAB relativement difficile à établir.

2.2. La ressource trophique : qualité vs quantité ?

2.2.1. Qualité de la ressource trophique

Les résultats de l'expérimentation 2 ont montré que la prévalence et l'intensité de la MAB ainsi que les variables hémoctaires, la réparation coquillière et les IC n'étaient pas influencés par la qualité des microalgues de fourrage en termes de composition en acides gras. Cette étude est la première à considérer à la fois une relation hôte-pathogène chez les bivalves et l'influence que pourrait avoir la qualité de l'algue de fourrage sur cette relation.

Avant toute chose, nous avons pu vérifier que la composition en acides gras polaires insaturés (AGPI) des lipides neutres des glandes digestives des palourdes reflétait bien les signatures typiques en AGPI des deux algues utilisées à savoir, *T-Isochrysis aff. galbana*, clone Tahitien (*T-Iso*) et *Chaetoceros calcitrans*. **Ce résultat indique que le conditionnement des animaux aux deux algues pendant 4 semaines a bien été effectif.** Pour rappel, l'algue *T-Iso* est riche en acide docosahexaénoïque (DHA ; 22:6n-3) mais pauvre en acide arachidonique (AA ; 20:4n-6) et en acide eicosapentaénoïque (EPA ; 20:5n-3) alors que *C. calcitrans* est riche en AA et en EPA mais pauvre en DHA.

La composition en AGPI des lipides polaires dans le manteau des palourdes a, quant à elle, été bien moins influencée par le régime algal que celles des lipides neutres de la glande digestive. En effet, les compositions en AGPI dans la fraction polaire des lipides du manteau étaient presque similaires que les animaux aient été nourris avec *T-Iso* ou *C. calcitrans*. **Ce**

résultat semble indiquer que les déficiences en AGPI induites par les deux régimes algaux ont été compensées dans le manteau des palourdes. Ce phénomène peut être dû à l'incorporation sélective des AGPI dans les lipides polaires comme cela a déjà été observé chez d'autres espèces de bivalves (Delaunay et al., 1993; Soudant et al., 1996; Copeman et al., 2002; Pernet and Tremblay, 2004) mais dans notre cas, il est particulièrement marqué.

Des incorporations en AGPI provenant de la nourriture tels que le DHA, l'AA et l'EPA ont été mises en évidence dans les lipides polaires des hémocytes et de branchies de *C. gigas* et *R. philippinarum* nourries avec les mêmes microalgues que celles utilisées dans notre étude (Delaporte et al., 2003, 2005). Cependant, leur proportion au sein de la fraction polaire était particulièrement influencée par le régime algal. Ces différences entre notre étude et celle de Delaporte et al. (2003) pourraient être dues à des capacités différentes d'incorporation des AGPI selon l'organe considéré, comme cela a déjà été constaté chez le pétoncle *Placopecten magellanicus* (Napolitano and Ackman, 1992) et *C. gigas* (Soudant et al., 1999). Par ailleurs, une période de conditionnement aux microalgues plus longue pourrait permettre d'observer des incorporations en AGPI plus marquées dans les lipides polaires des branchies de *R. philippinarum* (Delaporte et al., 2005). Dans un cas comme dans l'autre, **nos résultats indiqueraient donc que la régulation des AGPI dans les lipides polaires du manteau de *R. philippinarum* serait plus importante que dans d'autres organes.**

En outre, les palourdes japonaises utilisées par Delaporte et al. (2003) provenaient également de Marennes et ont été récoltées au printemps mais l'origine de ces animaux est certainement différente. Or, il a été montré chez *C. gigas* que l'incorporation sélective du DHA était modulée selon l'origine géographique et génétique des animaux (Pernet et al., 2008). On pourrait donc également supposer que **les différences d'incorporation d'AGPI dans les lipides polaires des palourdes de notre étude et celles de Delaporte et al. (2003) pourraient s'expliquer par l'origine des animaux.**

L'étude menée par Delaporte et al. (2003) a montré que l'incorporation des AGPI provenant des régimes monoalgaux (*T-Iso* et *C. calcitrans*) dans les lipides polaires des hémocytes induisait des modifications au niveau des paramètres hémocytaires de *R. philippinarum*. **Dans notre cas, le fait que les déficiences en AGPI des deux régimes algaux**

aient été compensées dans les lipides polaires du manteau de *R. philippinarum* pourrait expliquer qu'aucune différence ne soit obtenue pour les paramètres hématocytaires en fonction du conditionnement algal. Par conséquent, cela expliquerait également pourquoi aucune différence n'a été observée dans la prévalence et l'intensité de la MAB, ainsi qu'entre les palourdes nourries avec *C. calcitrans* ou T-Iso.

Cependant, il faut garder à l'esprit que les paramètres hématocytaires aussi bien que la réparation coquillère, l'IC, la prévalence et l'intensité de la MAB sont également dépendants d'autres facteurs externes et internes. Ainsi, comme nous l'avons évoqué précédemment, nos palourdes provenaient de Marennes où la prévalence MAB est relativement faible toute l'année (Paillard et al., 1997), où la présence de nourriture est également assurée presque toute l'année (Gouletquer et al., 1988). De plus, ces caractéristiques de la zone d'élevage de Marennes ont été associées aux meilleurs statuts immunitaires et physiologiques en comparaison aux îles Chausey, au golfe du Morbihan et à la rade de Brest (Soudant et al., 2004). Les palourdes utilisées au cours de notre expérimentation étaient initialement en bonne santé, indemnes de la MAB avec de forts IC et n'étaient pas en condition de stress nutritionnel au moment où elles ont été récoltées (mai 2015).

Finalement, notre étude a permis de montrer que la qualité de la ressource trophique, plus particulièrement de deux algues de fourrage couramment utilisées en aquaculture, n'avait à priori pas d'influence sur le développement de la MAB. De plus, on est en également en droit de penser que si une telle expérimentation devait être menée sur des palourdes prélevées en période hivernale et sur d'autres sites, elle pourrait alors conduire à des résultats différents.

2.2.2. Quantité de la ressource trophique

Lors de l'expérimentation 1, les animaux étaient à jeun et présentaient des stades de réparation coquillères bien plus faibles que ceux de l'expérimentation 2 où les animaux étaient nourris *ad libitum*. Si la qualité de la ressource trophique en termes de composition en acides gras ne semble pas influencer la réponse de *R. philippinarum* lors d'une exposition à *V. tapetis*, la quantité de cette ressource pourrait être plus déterminante dans le développement de la MAB. **La présence de ressource trophique jouerait alors un rôle majeur dans les processus de réparation de la palourde japonaise.** Cette hypothèse est

appuyée par les résultats de Plana et al. (1996) qui ont observé des réparations coquillères maximales chez des palourdes nourries à nouveau après un mois d'exposition à *V. tapetis* en condition de stress nutritionnel.

De plus, Flye-Sainte-Marie et al. (2007) supposent que l'augmentation des coûts énergétiques pour la maintenance de l'animal dus à la réponse immunitaire et à la réparation chez les animaux atteints de la MAB ne pouvait être compensée que chez un animal très bien nourri (Flye-Sainte-Marie et al., 2009a). **Ces observations nous mènent alors à proposer l'hypothèse suivante : la réponse immunitaire « positive » des animaux exposés à *V. tapetis* serait reliée à la présence de ressource trophique en quantité suffisante pour leur permettre de compenser les coûts énergétiques de maintenance. Cette hypothèse pourrait être testée par une expérimentation supplémentaire visant à évaluer un effet dose (des algues)/réponse (de l'hôte).**

3. Réponse métabolique de la palourde japonaise lors d'une exposition à *V. tapetis*

L'expérimentation 2 a permis d'observer différentes phases dans la réponse de la palourde à *V. tapetis* en fonction de sa résistance à l'apparition de signes cliniques de la MAB. Ainsi, un parallèle peut être fait entre la modulation de la réponse de *R. philippinarum* sous l'effet du stresser *V. tapetis* et les étapes d'un syndrome général d'adaptation (SGA).

Pour cette étude, le manteau est l'organe qui a été choisi puisqu'il est directement en contact avec le site d'infection de la MAB. Cet organe est également à l'origine des sécrétions permettant la mise en place des couches de conchioline et des couches coquillères associées au processus de réparation de la MAB. Par ailleurs, afin de pouvoir effectuer un maximum d'analyses biochimiques, nous avons décidé d'effectuer cette étude en pools d'individus. La constitution de ces pools a été évoquée dans la section « Matériel et méthodes » de ce manuscrit. L'intérêt de cette étude réside dans la séparation des individus injectés avec *V. tapetis* en deux groupes :

- Les MAB- : palourdes ne développant pas d'anneau brun
- Les MAB+ : palourdes développant un anneau brun

Cette distinction servira notamment à expliquer comment à 7 jours post-injection, certaines palourdes « résistent » encore à l'apparition des signes cliniques de la MAB (MAB-) alors que la plupart sont malades (MAB+).

Les témoins sont les animaux qui ont été injectés avec de l'eau de mer filtrée stérile et qui n'ont pas développé de signes cliniques de la MAB.

Un second intérêt de cette étude réside dans la volonté de mieux comprendre le fonctionnement du système antioxydant enzymatique chez *R. philippinarum* en lien avec l'activité d'autres enzymes reliées à l'immunité et au métabolisme énergétique des glucides.

Enfin, cette étude est la première à étudier la formation du monoxyde d'azote (NO) par l'activité de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) lors du suivi d'une infection chez un bivalve.

3.1. Réponse de *R. philippinarum* à *V. tapetis* : phase aiguë du stress à 2 jours post-injection

Lors de l'expérimentation 2, la prévalence de la MAB à 2 jours post-injection était de 8 % toutes conditions confondues.

Une diminution des activités antioxydantes (t-SOD, Cu/Zn-SOD, Se-GPx), à l'exception de l'augmentation de la CAT, a été observée chez les MAB- 2 jours post-injection. En effet, l'augmentation de la CAT confirme que le peroxyde d'hydrogène a été produit en concentration importante dans les cellules du manteau (Rhee et al., 2005; Pamplona and Costantini, 2011). Le fait que l'activité SOD soit diminuée pourrait alors s'expliquer par une inhibition due aux fortes concentrations en peroxyde d'hydrogène (McBride et al., 1999; Tarhan and Tuzmen, 2000). Par ailleurs, l'activité Se-GPx est généralement associée aux faibles concentrations en peroxydes contrairement à la CAT, ce qui expliquerait sa diminution (Rhee et al., 2005; Pamplona and Costantini, 2011; Wang et al., 2011, 2013). **Finalement, la diminution générale des activités antioxydantes et l'augmentation de la CAT amènent à supposer qu'il y a accumulation des ERO dans les cellules du manteau des MAB- à deux jours post-injection.**

L'activité iNOS était aussi plus élevée chez les MAB- par rapport aux témoins, ce qui semble aller dans le sens d'une augmentation de la production du monoxyde d'azote (NO) et par conséquent des espèces réactives de l'azote (ERA). De plus, lorsque l'anion

superoxyde et le NO sont produits, ils peuvent également former une autre espèce réactive encore plus toxique : l'ion péroxynitrite (ONOO⁻). **Ces résultats indiquent probablement une réaction de défense immunitaire visant à neutraliser le pathogène par la production d'espèces chimiques réactives qui lui sont toxiques.** En effet, la production d'ERO et d'ERA a déjà été associée à la réponse immunitaire chez plusieurs espèces de bivalves (Arumugan et al., 2000; Tafalla et al., 2002; Bugge et al., 2007; Villamil et al., 2007; Costa et al., 2008). De plus, une augmentation de la concentration en nitrates et nitrites, des produits de dégradation du NO, a déjà été observée dans le cadre d'une exposition *in vitro* des fluides corporels (fluides extrapalléaux et hémolymphe) de *R. philippinarum* à *V. tapetis* (Jeffroy and Paillard, 2011), ce qui va dans le sens de nos résultats.

Durant la phase d'alarme ou phase aigüe du stress du SGA, l'animal voit ses défenses immunitaires diminuer dans un premier temps puis celles-ci vont commencer à augmenter rapidement afin de faire face à la condition stressante (Selye, 1950). Par analogie, on pourrait donc considérer cette réponse à 2 jours post-injection comme la fin de la phase aigüe du stress avec une augmentation de la production d'ERO et d'ERA afin de lutter contre *V. tapetis*. Un schéma récapitulatif de ces résultats est proposé en Figure 38 où le choix a été fait de représenter un hémocyte infiltré dans le manteau même si, à l'heure actuelle, le type cellulaire impliqué dans la réponse immunitaire de la palourde au niveau de ce tissu n'est pas connu. Les schémas récapitulatifs des réponses à sept jours post-injection représenteront également un hémocyte.

3.2. Réponse de *R. philippinarum* à *V. tapetis* : phase de résistance à 7 jours post-injection

Suite à la phase aigüe du stress observée à 2 jours post-injection, une phase de résistance a été décrite chez les animaux injectés avec *V. tapetis* à 7 post-injection. Lors de cette phase, la résistance de l'animal au stress est élevée ; celui-ci mobilise ses ressources énergétiques dans la réponse immunitaire et métabolique pour permettre un retour à l'homéostasie, c'est ce qui caractérisera les MAB-. Cette phase peut être associée à l'apparition de dysfonctionnements dans l'organisme voire de maladie (Selye, 1946, 1950, 1952). Dans ce cas, l'apparition de la maladie sera observée chez les MAB+.

3.2.1. Une résistance à l'apparition des signes cliniques chez les MAB-

L'activité de plusieurs enzymes antioxydantes (t-SOD, Cu/Zn-SOD, CAT, GR) a augmenté chez les MAB- par rapport aux témoins et aux MAB+ à 2 et 7 jours post-injection. Cette suractivation est sans doute le signe que les MAB- prennent en charge les ERO et les ERA de façon efficace par rapport aux MAB+. La prise en charge des différentes espèces toxiques générées afin lutter contre l'infection permettrait aux individus MAB- de retrouver un état d'homéostasie redox (Hermes-Lima, 2004). De plus, l'activation de la GR est intéressante car cette enzyme, en réduisant le glutathion oxydé ($GSSG \rightarrow 2 GSH$) fournit un cosubstrat pour la GPx et produit en même temps un antioxydant non-enzymatique. Ainsi, la GR participe activement au maintien de l'homéostasie redox cellulaire (Winston and Digiulio, 1991; Hermes-Lima, 2004). La GR produit également du $NADP^+$ qui est disponible pour d'autres enzymes, et notamment la glucose 6-P déshydrogénase (G6PDH), une enzyme impliquée dans la voie des pentoses phosphates. Ainsi, l'activation de la GR pourrait également permettre la production d'énergie pour assurer les processus de défense (Kletzien et al., 1994; Hermes-Lima, 2004). Cependant, cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée par l'activité d'autres enzymes comme l'hexokinase (HK) situées en amont de l'activité G6PDH. **Par ailleurs, l'activité PO était également augmentée chez les MAB- par rapport aux témoins et aux MAB+ à 2 et 7 jours post-injection, suggérant ainsi la production de quinones toxiques associée à la défense contre le pathogène. Ainsi, l'augmentation des activités antioxydantes et PO pourrait être associée à la résistance des palourdes à l'apparition des premiers signes cliniques de la MAB.** Si l'activité PO a déjà été associée à une résistance à la maladie QX chez des huitres *Saccostrea glomerata* sélectionnées (Butt & Raftos, 2008), en revanche, l'activation du système antioxydant n'a jamais été étudiée dans le cadre de résistance à des maladies chez les mollusques bivalves.

Finalement, la phase de résistance des MAB- est caractérisée par une réponse immunitaire et antioxydante qui permettrait un retour à l'homéostasie. L'étude des MAB- à 7 jours post-injection permet de proposer de nouveaux indicateurs biochimiques qui pourraient être utilisés pour la sélection de palourdes résistantes à la MAB : PO, Cu/Zn-SOD, CAT et GR. Un schéma récapitulatif de ces résultats est proposé en Figure 39.

3.2.2. L'apparition des signes cliniques chez les MAB+

Une diminution de l'activité de la GST, une enzyme permettant la détoxification des xénobiotiques et des lipoperoxydes, et de la Se-GPx, une enzyme impliquée dans la prise en charge du peroxyde d'hydrogène, a été observée chez les MAB+ par rapport aux témoins et aux MAB- à 7 jours post-injection. De plus, l'activité de la iNOS était également augmentée chez ces individus par rapport aux témoins et aux MAB- à 2 et 7 jours post-injection. La baisse des activités GST et Se-GPx et l'augmentation de l'activité iNOS pourrait entraîner l'accumulation d'ERO et d'ERA et ainsi occasionner un état de stress oxydatif/nitrosatif chez les individus MAB+. En effet, l'augmentation des niveaux de lipoperoxydes en même temps que la baisse des activités GST et CAT a été observée au cours du temps chez la moule *Mytilus edulis* suite à une exposition à *Vibrio splendidus* (Canesi et al., 2010). **Cependant, dans notre étude, l'indice d'insaturation des lipides polaires n'a pas permis de conclure quant à de possibles dommages au niveau des lipides des individus BRD+ à 7 jours post-injection.** Un schéma récapitulant ces résultats est proposé en Figure 40.

3.3. La réponse de *R. philippinarum* à *V. tapetis* : phase d'épuisement

La dernière étape du SGA décrit par Selye (1950), qui n'est pas obligatoire, est l'étape d'épuisement. Durant cette étape, l'animal épuise ses ressources énergétiques ce qui ne lui permet plus d'assurer les fonctions immunitaires et métaboliques : son pronostic vital est en jeu. Dans le cadre de notre expérimentation, ce dernier stade n'a pas été atteint pas les palourdes puisque leurs réserves et les activités associées au métabolisme énergétique n'ont pas été impactées suite à l'infection par *V. tapetis*. De plus, aucune modification des réponses associées à l'immunité, au système antioxydant et au métabolisme énergétique n'a été détectée à plus long terme. En effet, cela est cohérent avec une guérison presque complète des individus, des IC stables ainsi que des activités du métabolisme énergétique stables. **Finalement, on peut supposer que les palourdes, étant dans des conditions nutritionnelles idéales, puisaient l'énergie nécessaire pour le fonctionnement de leurs défenses contre *V. tapetis* sans qu'il n'y ait de coût énergétique.**

3.4. Une réponse observée chez des mâles matures

Etant donné que nos animaux étaient matures lors de l'expérimentation et dans un souci de représenter au mieux la population expérimentale de palourdes, nous avons effectué nos pools avec des palourdes uniquement mâles et matures. Ainsi, encore une fois, des précautions doivent être prises quant à la généralisation de nos résultats. Si le sexe et la maturité sexuelle peuvent avoir un impact sur les activités antioxydantes, une seule étude a évalué l'impact de l'investissement dans la reproduction sur les défenses antioxydantes chez *C. gigas* (Béguel et al., 2013). Cependant, les résultats obtenus au niveau des branchies de *C. gigas* n'ont pas mis en évidence de différences dans les activités antioxydantes entre animaux ayant une forte ou une faible occupation gonadique. Cependant, l'expression des gènes codant la EC-SOD, la Mn-SOD et la GPx étaient surexprimés chez les animaux à forte occupation gonadique en comparaison aux animaux à faible occupation gonadique (Béguel et al., 2013). Ces travaux montrent qu'il faudrait approfondir les connaissances actuelles sur les effets potentiels de la maturité sexuelle sur les activités antioxydantes mais également sur les autres enzymes chez les bivalves.

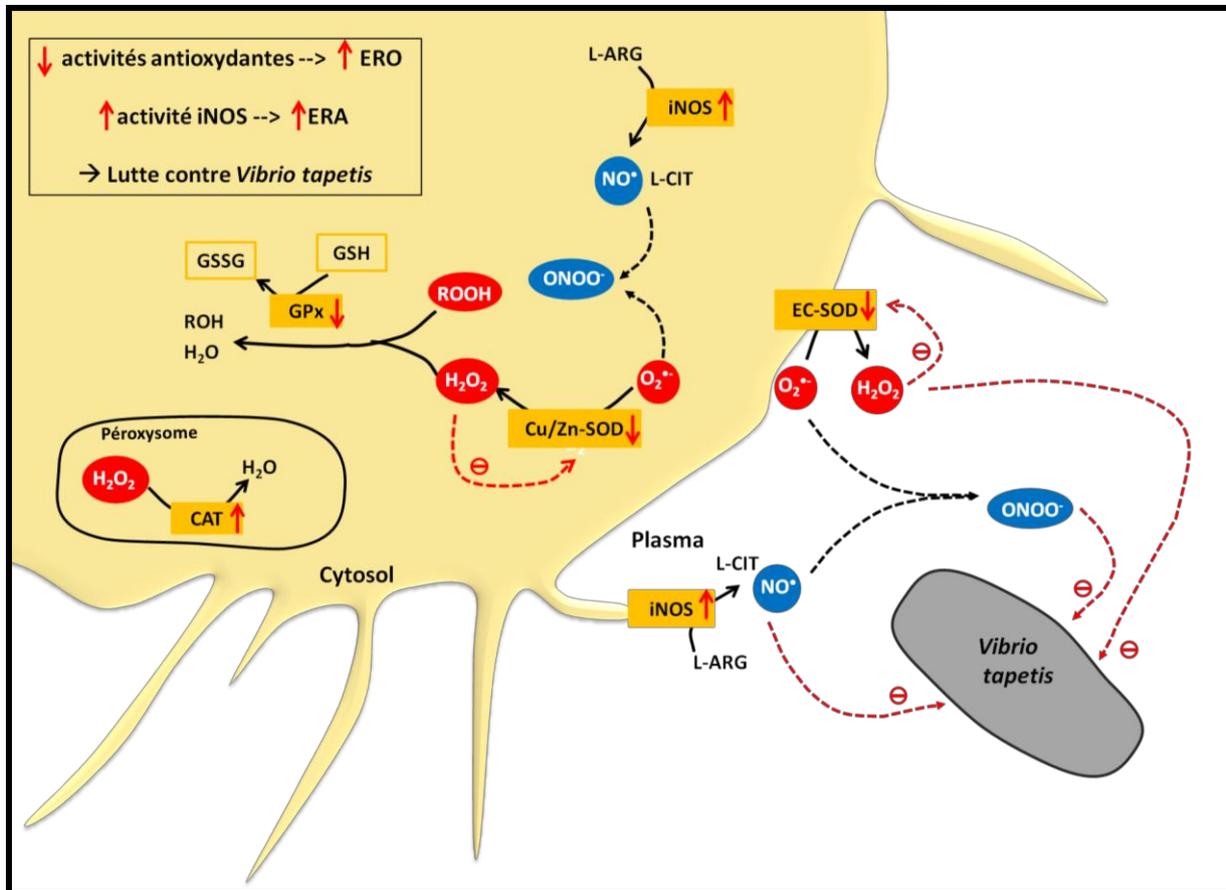
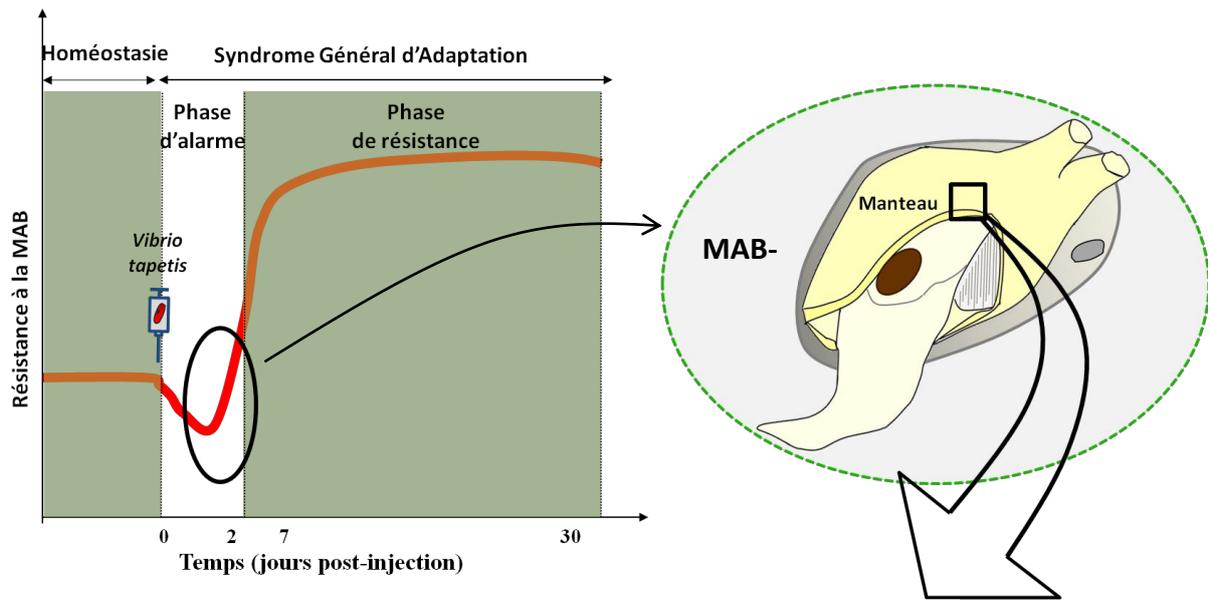


Figure 38 : Schéma récapitulatif (hypothétique) de la réponse de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis* et ne présentant aucun signe clinique apparent de la maladie de l'anneau brun deux jours post-injection.

Pour plus de clarté, *V. tapetis* est représenté en dehors de l'hémocyte, mais il peut également être phagocyté. Abréviations : ERO, espèces réactives de l'oxygène ; ERA, espèces réactives de l'azote ; GPx, glutathion peroxydase ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé ; Cu/Zn SOD, superoxyde dismutase Cu/Zn ; CAT, catalase ; iNOS, oxyde nitrique synthase inductible ; EC-SOD, superoxyde dismutase extracellulaire.

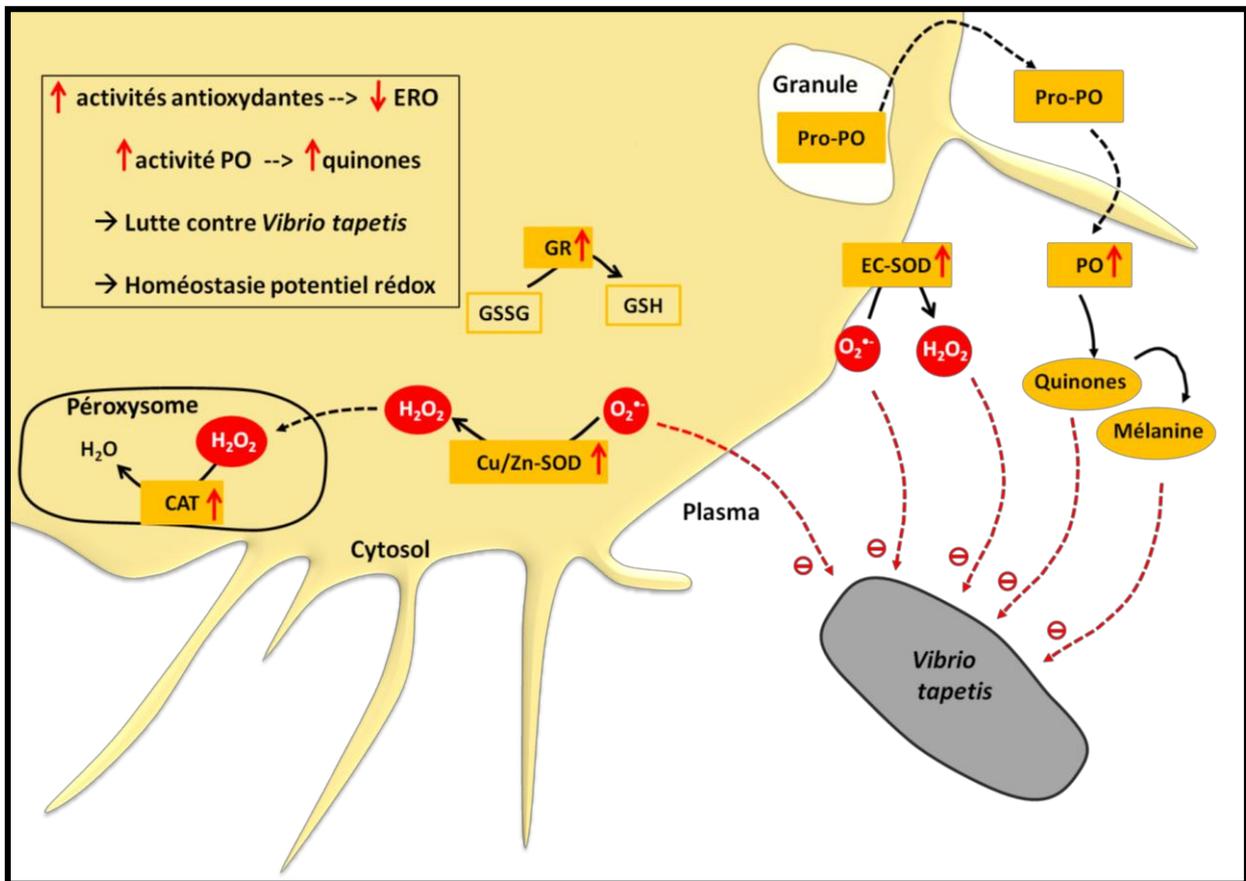
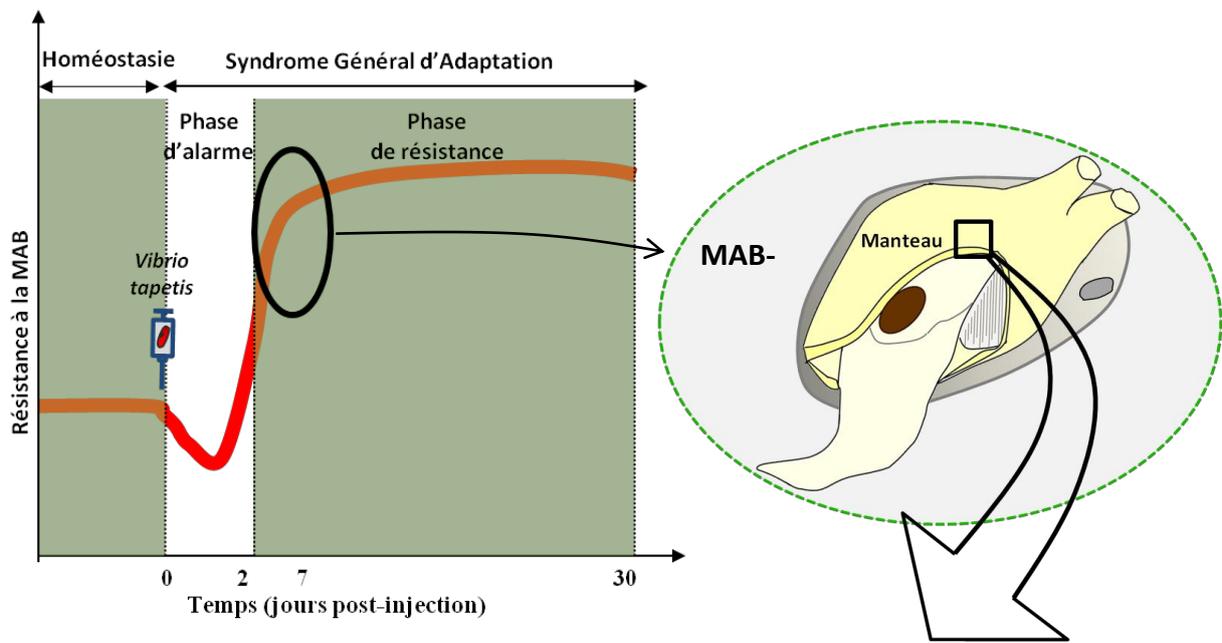


Figure 39 : Schéma récapitulatif de la réponse de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis* et ne présentant aucun signe clinique apparent sept jours post-injection.

Pour plus de clarté, *V. tapetis* est représenté en dehors de l'hémocyte, mais il peut également être phagocyté. Abréviations : ERO, espèces réactives de l'oxygène ; ERA, espèces réactives de l'azote ; GR, glutathion reductase ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé ; Cu/Zn SOD, superoxyde dismutase Cu/Zn ; CAT, catalase ; PO, phénoloxydase ; proPO, pro-phénoloxydase ; EC-SOD, superoxyde dismutase extracellulaire.

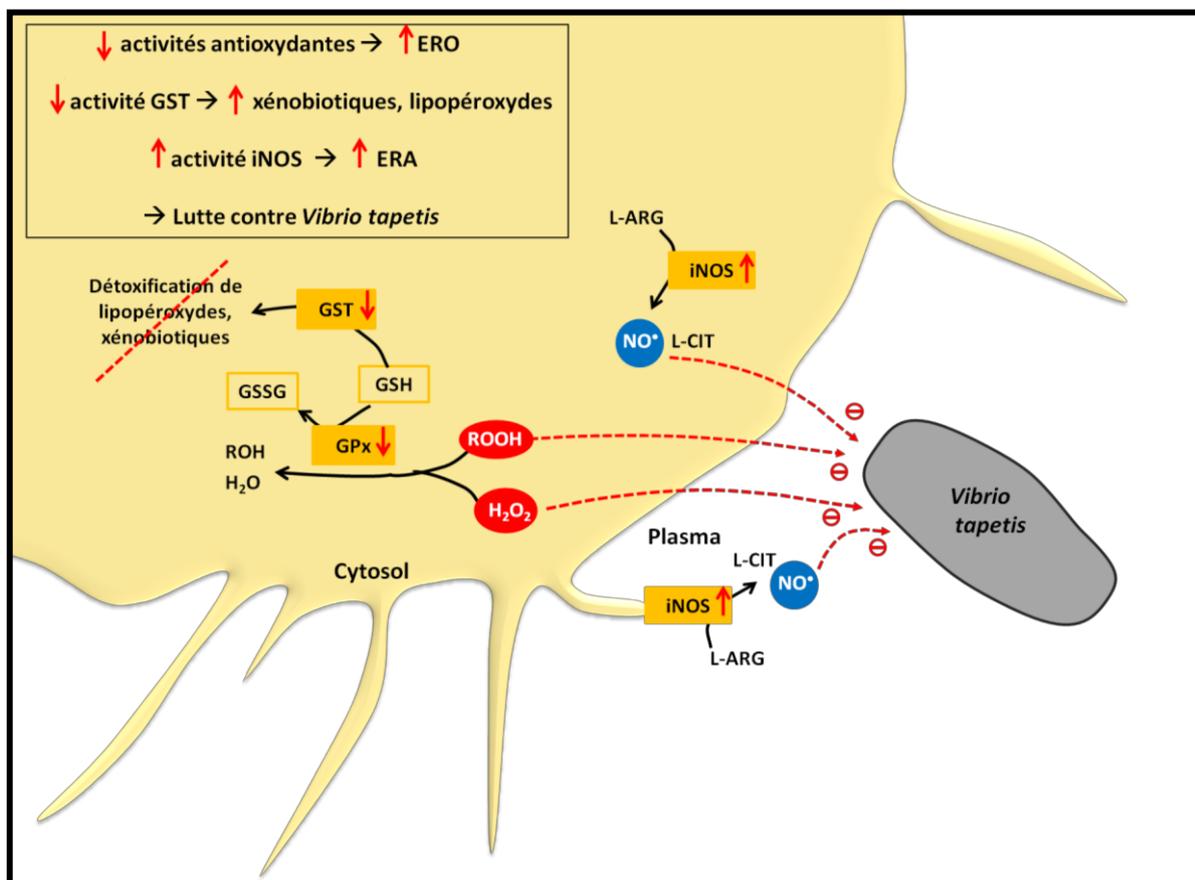
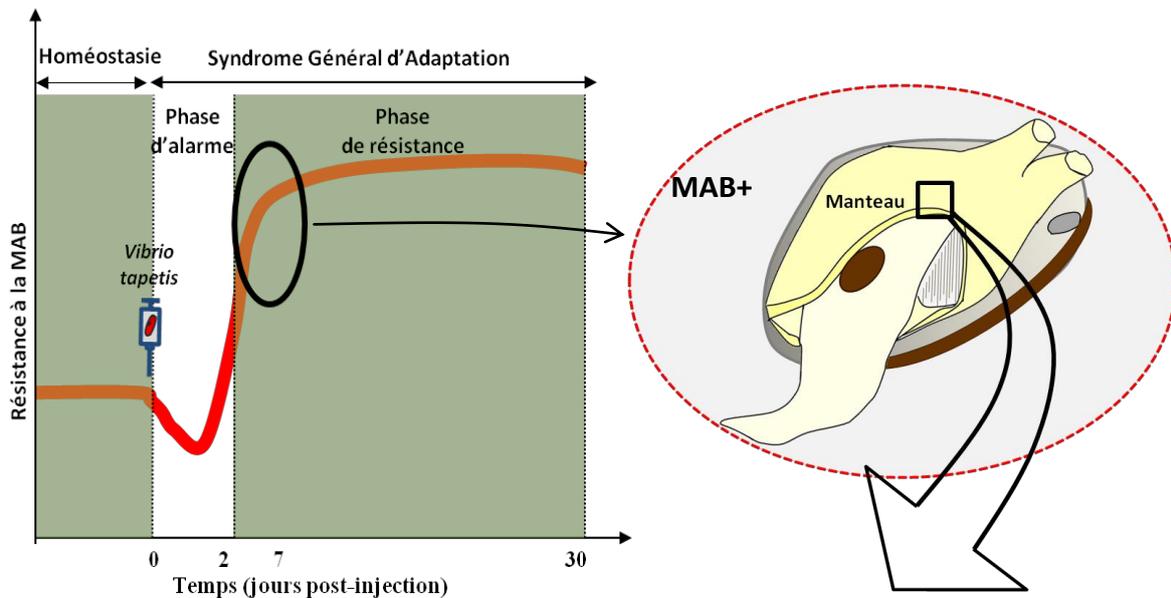


Figure 40 : Schéma récapitulatif de la réponse de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis* exprimant la maladie de l'anneau brun sept jours post-injection.

Pour plus de clarté, *V. tapetis* est représenté en dehors de l'hémocyte, mais il peut également être phagocyté. Abréviations : ERO, espèces réactives de l'oxygène ; ERO, espèces réactives de l'azote ; GPx, glutathion peroxydase ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé ; iNOS, oxyde nitrique synthase inductible ; GST, glutathion-S-transférase.

Conclusion et perspectives

La maladie de l'anneau brun (MAB) résulte d'une interaction entre un hôte, la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*, un pathogène *Vibrio tapetis* et leur environnement. Dans ce cadre, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence l'influence de certains facteurs externes (environnementaux) et internes (inhérents à l'hôte et au pathogène) sur le développement de la maladie. Parmi les facteurs environnementaux pouvant influencer la MAB, la température et la nourriture semblent être ceux qui affectent le plus son développement (Plana et al., 1996, Paillard et al., 2004b, Paillard et al., 2014). C'est pourquoi nos études ont principalement considéré ces deux facteurs.

Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer l'effet d'une augmentation de la température et de l'infection par deux souches de *V. tapetis* contrastées en termes de virulence sur (1) le développement de la MAB et (2) la réponse immunitaire et antioxydante de *R. philippinarum*. Cette première étude a montré qu'une perte de la virulence des deux souches était observée à 22 °C. Dans le même temps, la réponse immunitaire des animaux face à l'infection par les deux souches de *Vibrio* était meilleure à 22°C qu'à 15°C. **Dans un contexte de changement global, si la température des océans devait augmenter de 1 ou 2 °C (Byrne et al., 2010), on pourrait *a priori* envisager une diminution de la prévalence de la MAB chez *R. philippinarum*. Cependant, une augmentation de la température pourrait également modifier la virulence d'autres souches et influencer la condition des animaux (statut de reproduction, statut de santé), on ne peut donc pas être catégorique quant au devenir de la MAB dans ces conditions.**

La deuxième expérimentation menée au cours de cette thèse a eu pour objet d'évaluer l'effet de deux régimes monoalgaux contrastés en termes de composition lipidique et l'effet de la maturation sexuelle de *R. philippinarum* sur le développement de la MAB. Les résultats de cette étude ont montré que la prévalence et l'intensité de la MAB n'étaient pas influencées par la qualité de la microalgue de fourrage mais uniquement par l'injection de *V. tapetis*. De plus, ni la qualité des microalgues, ni l'injection de *V. tapetis* n'ont eu d'impact sur les variables hématocytaires mesurées dans l'hémolymphe des palourdes. **Mais qu'en serait-il pour les variables hématocytaires des fluides extrapalléaux ? Si ces paramètres ne sont pas modulés dans l'hémolymphe, on peut penser qu'ils le seraient dans le compartiment où la condition stressante est directement appliquée, *i.e.*, au niveau de la cavité extrapalléale. Ainsi, il serait judicieux de mesurer ces paramètres dans**

l'hémolymphe et dans les fluides extrapalléaux lors des prochaines expérimentations *in vivo* utilisant le mode d'injection extrapalléal.

En ce qui concerne l'effet des algues, la composition en acides gras de la fraction polaire des lipides du manteau était presque similaire chez les animaux quel que soit le régime algal considéré, ce qui expliquerait que les variables hémoctaires n'aient pas été impactées par le régime algal. **Une expérimentation avec une période de conditionnement aux régimes monoalgaux plus longue permettrait d'obtenir des compositions en acides gras polyinsaturés plus marquées dans les lipides polaires des animaux nourris avec *T-Iso* et *C. calcitrans*.** De plus, les animaux ont montré de remarquables capacités de réparation coquillère et leurs indices de condition (IC) étaient élevés quelle que soit la condition considérée, témoignant d'un bon état de santé initial des animaux mais également suite à l'infection expérimentale. La quantité de la ressource trophique, plutôt que sa qualité, pourrait avoir contribué au maintien de la bonne condition des palourdes au cours de l'expérimentation. **Cette hypothèse pourrait être vérifiée par une expérimentation complémentaire visant à évaluer un effet dose/réponse de la quantité d'algue fournie sur les variables hémoctaires, les indices de réparation coquillère, les IC des palourdes.**

Lors de notre étude, nous avons également remarqué que l'intensité de la maladie était plus importante chez les animaux les plus matures sexuellement. Ce résultat impliquerait qu'un compromis énergétique a lieu entre les processus de reproduction et de défense immunitaire de l'animal. De plus, les paramètres hémoctaires, les IC ainsi que les taux de réparation n'ont pas été influencés par les stades de maturité sexuelle des animaux. Il est probable que les effets immunitaires associés au compromis énergétique défense/reproduction n'aient pas été observés du fait de stades de maturité pas assez avancés et, notamment de l'absence de ponte. **Une étude complémentaire reproduisant un cycle de reproduction des animaux, permettrait de caractériser plus précisément les compromis énergétiques de la palourde *R. philippinarum*, exposée à *V. tapetis*.**

L'influence des différents facteurs étudiés au cours de cette thèse sur l'interaction hôte-pathogène-environnement conduisant à l'expression de la MAB est synthétisée sur la Figure 41. Si l'on considère que l'augmentation de la température (22 °C) et la présence de ressource trophique en quantité suffisante permettent d'obtenir un meilleur statut

immunitaire de la palourde de manière isolée, on pourrait alors penser que la combinaison de ces deux facteurs permettrait de limiter le développement de la MAB. Cependant, température et ressource trophique sont également les facteurs qui influencent le plus le processus de gamétogénèse chez les bivalves (Mann, 1979, Laing & Child, 1996, Delaporte et al., 2006). Or, nous avons mis en évidence que les animaux les plus matures étaient également ceux qui présentaient des intensités de MAB les plus fortes, lorsque la température était maintenue à 13 °C. **Il serait donc intéressant d'étudier l'impact d'une augmentation de la température en association avec un apport trophique *ad libitum* afin de savoir si un compromis énergétique entre le processus de reproduction de la palourde et ses défenses a lieu et, si tel est le cas, quelles en seraient les conséquences sur le développement de la MAB.**

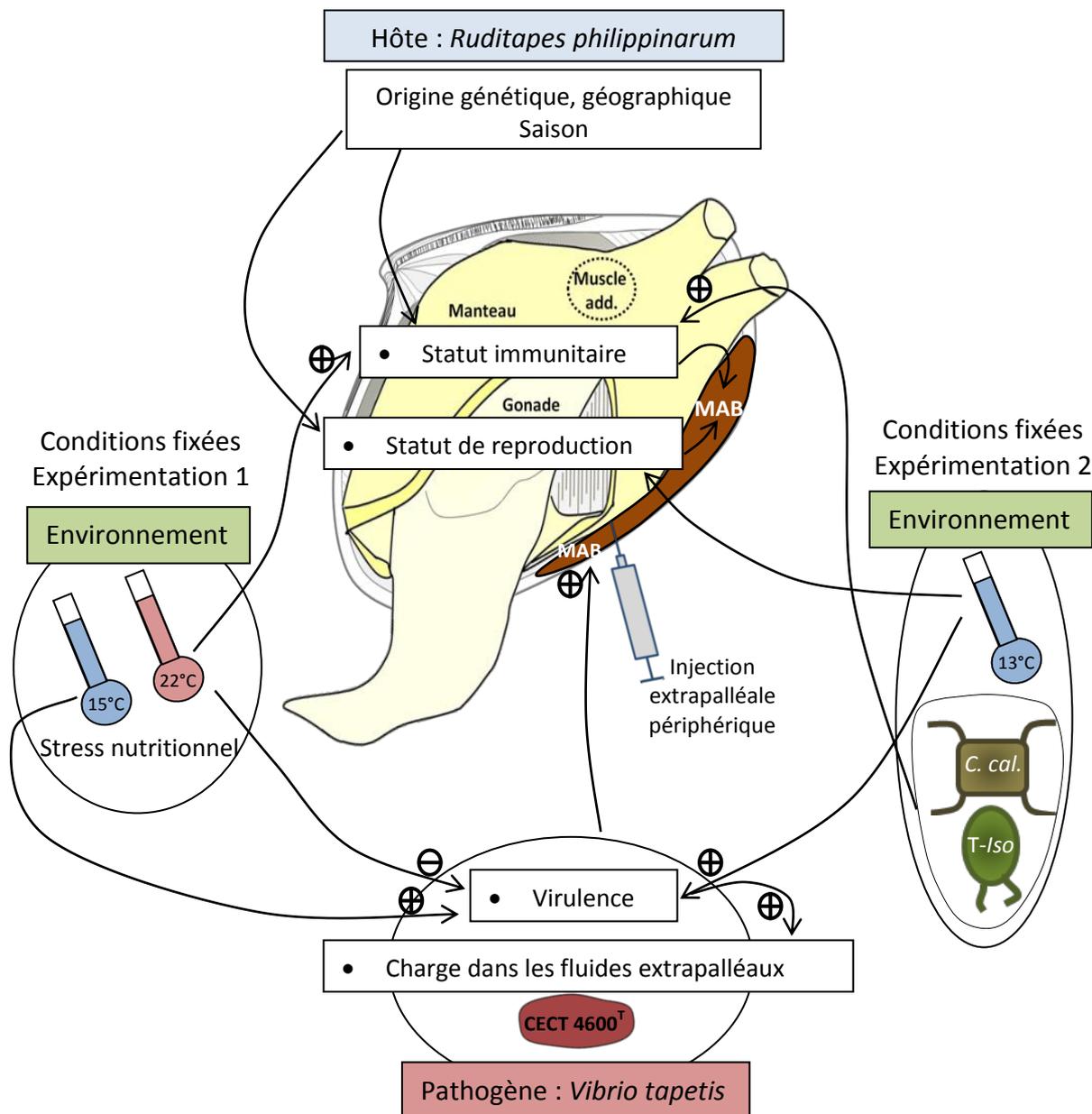


Figure 41 : Schéma bilan simplifié représentant l'influence des facteurs externes et internes, étudiés au cours de cette thèse, sur l'interaction *Ruditapes philippinarum*-*Vibrio tapetis*-environnement.

Sur ce schéma figurent les conditions expérimentales fixées lors des expérimentations 1 et 2. Par ailleurs, dans un souci de clarté, la seconde souche de *V. tapetis* utilisée lors de l'expérimentation 1 n'est pas représentée sur schéma. Les flèches représentées avec un symbole + ou - signifient que l'influence est positive ou négative respectivement. Les flèches représentées sans symbole signifient qu'une influence positive ou négative peut être envisagée.

Afin de vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de mesurer ces ERO au sein de ce tissu mais celles-ci sont associées à des temps de demi-vie très courts allant de quelques nanosecondes à quelques microsecondes (Hermès-Lima, 2004, Pamplona & Costantini, 2011). Par ailleurs, à deux jours post-injection, l'activité iNOS est plus importante chez les MAB- par rapport aux témoins, ce qui résulterait en une production de monoxyde d'azote (NO) et donc d'espèces réactive de l'azote (ERA). Suite à cette phase, nous avons observé une « phase tardive » ou « phase de résistance » au cours de laquelle l'apparition des premiers signes cliniques de la MAB à 7 jours post-injection a été reliée à une augmentation des activités antioxydantes (t-SOD ; Cu/Zn-SOD ; catalase, CAT ; glutathion réductase, GR) et PO dans le manteau des MAB-. Cette amélioration générale des capacités antioxydantes et immunitaires suggère qu'un retour à l'homéostasie redox s'opère chez les MAB- mais également qu'une réponse immunitaire liée à l'activité PO est mise en place afin de lutter contre *V. tapetis*. Par ailleurs, l'apparition des signes cliniques de la maladie chez les MAB+ lors de cette phase a été associée à la diminution des activités GST et Se-GPx ainsi qu'à l'augmentation de l'activité iNOS au niveau du manteau. Cependant, les indices d'insaturation des lipides polaires étaient similaires entre les témoins, les MAB- et les MAB+, ce qui suggère que la réduction des activités GST et Se-GPx n'a pas été suffisamment forte pour mener à une accumulation d'ERO qui conduirait à la dégradation des lipides membranaires. **Afin de confirmer ou d'infirmer l'occurrence d'un stress oxydatif, il serait également nécessaire de quantifier d'autres dommages qui peuvent être causés à l'ADN par l'utilisation du test des comètes ou encore aux protéines par le dosage des protéines carbonylées.**

Enfin, notre étude n'a pas permis d'observer la dernière phase décrite dans le SGA, la phase d'épuisement consistant en un déséquilibre énergétique quand les réserves sont épuisées et que l'animal ne peut plus assurer les fonctions immunitaires et métaboliques. Finalement, qu'il s'agisse des BRD- ou des BRD+, la réponse observée dans les 30 jours de suivi post-injection est une réaction de résistance.

Finalement, cette étude a permis d'identifier des indicateurs biochimiques tels que les enzymes antioxydantes (SOD, CAT, Se-GPx, GR) et des enzymes impliquées dans le système immunitaire inné (PO, iNOS), qui ont été associés aux réponses métaboliques de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis*, selon le stade de développement de la MAB. **L'utilisation**

de ces indicateurs biochimiques pourrait alors permettre d'établir des critères de sélection d'individus résistants à la MAB et plus généralement, ils pourraient être utilisés pour caractériser le statut immunitaire de palourdes exposées à d'autres stressseurs biotiques.

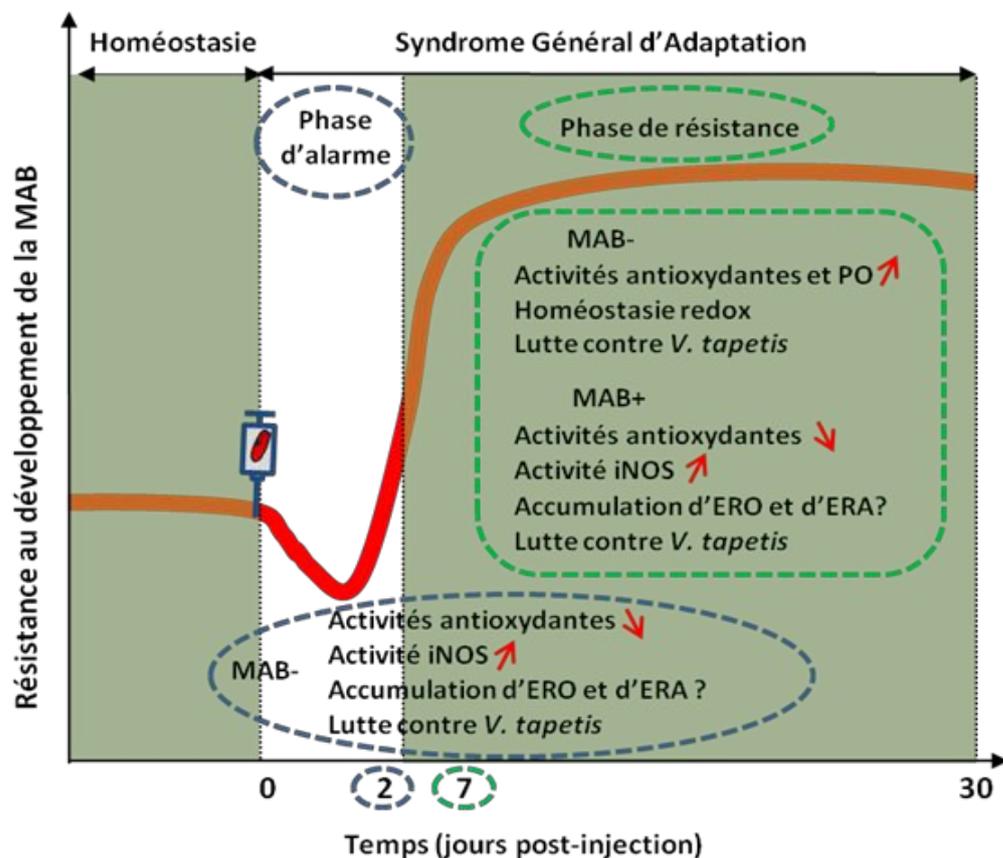


Figure 42 : Schéma bilan de la modulation de l'activité des enzymes liées au système antioxydant et au système immunitaire inné chez *Ruditapes philippinarum* exposée à *Vibrio tapetis* par injection en cavité extrapalléale périphérique.

Abréviations : ERO, espèces réactives de l'oxygène ; ERA, espèces réactives de l'azote ; PO, phénoloxydase ; MAB-, animaux exempts de signes cliniques de la maladie de l'anneau brun ; MAB+, animaux ayant développé un anneau brun.

Outre les indicateurs biochimiques et cellulaires qui ont été largement utilisés afin de caractériser la réponse de la palourde japonaise exposée à *V. tapetis*, plusieurs études ont recherché des indicateurs moléculaires de cette réponse en utilisant des approches en transcriptomique. Des marqueurs moléculaires associés à l'immunité, l'apoptose et l'organisation du cytosquelette ont pu être identifiés à partir d'une étude des gènes différentiellement exprimés par les hémocytes de *R. philippinarum* exposés *in vitro* à *V.*

tapetis durant 3h (Brulle et al., 2012). De plus, les résultats obtenus à partir de banques soustractives d'ADNc issues de manteau et d'hémocytes de palourdes infectées par *V. tapetis* ont permis d'identifier des gènes impliqués dans la biominéralisation et dans la réponse immunitaire (Jeffroy et al., 2013). Enfin, l'étude la plus récente a utilisé la technique oligoarray ou « puce à ADN » afin de caractériser les réponses moléculaires associées à la MAB au niveau de l'hémolymphe, des fluides extrapalléaux et du manteau de *R. philippinarum* (Allam et al., 2014). Les résultats de cette étude ont montré une expression différentielles de gènes impliqués dans la reconnaissance des pathogènes, la défense immunitaire (notamment la PO), le système antioxydant (SOD, GPx) l'apoptose mais également dans la biominéralisation et ce, de manière tissu-spécifique.

Ces études transcriptomiques à haut débit sont particulièrement intéressantes puisqu'elles permettent, par une approche sans *a priori*, de caractériser des individus, des tissus, des cellules contrastées pour une condition donnée. Ainsi, pour l'expérimentation 2 visant à évaluer l'effet de la qualité des microalgues de fourrage en termes de composition lipidiques sur la réponse de *R. philippinarum* lors d'une infection par *V. tapetis*, il a été prévu d'effectuer une étude transcriptomique à haut débit sur les fluides extrapalléaux de palourdes saines et de palourdes présentant des signes cliniques de la MAB. Cette étude complémentaire à l'expérimentation 2 sera effectuée dans le cadre d'une collaboration franco-brésilienne entre le LEMAR et le laboratoire de microbiologie de l'Université Fédérale de Rio de Janeiro (UFRJ). Un premier objectif de cette étude consiste en l'identification de voies de signalisations mises en place par *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis* ainsi que leur régulation. Pour ce faire, une approche RNASeq permettra de séquencer l'ensemble des ARN messagers de nos échantillons et donc d'avoir une vue globale des transcrits, de leurs variants en adoptant une approche comparative entre individus sains et individus malades. Le second objectif²¹ de cette étude sera de caractériser le rôle potentiel de la microflore bactérienne associée à *R. philippinarum* dans cette interaction hôte-pathogène. Il s'agit donc ici d'adopter une approche métatranscriptomique afin de répondre à ces deux objectifs.

²¹ Pour cette étude complémentaire une mobilité de 2 mois a été effectuée au laboratoire de microbiologie de l'UFRJ au cours de ma thèse. Elle se poursuivra par une mobilité grâce à un premier contrat post-doctoral au sein de ce laboratoire.

Bibliographie

- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.-O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J. Exp. Biol.* 205, 1831–1841.
- Abele, D., Puntarulo, S., 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 138, 405–415.
- Adhya, M., Jeung, H.-D., Kang, H.-S., Choi, K.-S., Lee, D.S., Cho, M., 2012. Cloning and localization of MCdef, a defensin from Manila clams (*Ruditapes philippinarum*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 161, 25–31. doi:10.1016/j.cbpb.2011.09.003
- Aebi, H., 1984. Catalase Invitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Aladaileh, S., Nair, S.V., Raftos, D.A., 2008. Effects of noradrenaline on immunological activity in Sydney rock oysters. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 627–636.
- Aladaileh, S., Nair, S.V., Raftos, D.A., 2007. Induction of phenoloxidase and other immunological activities in Sydney rock oysters challenged with microbial pathogen-associate molecular patterns. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 1196–1208. doi:10.1016/j.fsi.2007.05.003
- Alderton, W.K., Cooper, C.H., Knowles, R., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593–615.
- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A., Ford, S.E., 2001. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 365–375. doi:10.1016/S0145-305X(00)00072-0
- Allam, B., Espinosa, E.P., Tanguy, A., Jeffroy, F., Le Bris, C., Paillard, C., 2014. Transcriptional changes in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in response to Brown Ring Disease. *Fish Shellfish Immunol.* 41, 2–11. doi:10.1016/j.fsi.2014.05.022
- 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 Shellfish Immunol.* 20, 374–383. doi:10.1016/j.fsi.2005.05.012
- Allam, B., Paillard, C., 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aquat. Organ.* 33, 123–128. doi:10.3354/dao033123
- 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*. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 63–69. doi:10.1006/jipa.2000.4940
- Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., Ford, S.E., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following in vivo challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 384–397. doi:10.1016/j.fsi.2005.05.013
- Allam, B., Paillard, C., Ford, S.E., 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis. Aquat. Organ.* 48, 221–231. doi:10.3354/dao048221
- Allam, B., Paillard, 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. doi:10.3354/dao041105
- Allam, B., Raftos, D., 2015. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *J. Invertebr. Pathol.*
- Andersen, S.O., 2010. Insect cuticular sclerotization: a review. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 166–178.

- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46. doi:10.1046/j.1442-9993.2001.01070.x
- Andres Aranda-Burgos, J., da Costa, F., Novoa, S., Ojea, J., Martinez-Patino, D., 2014. Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* larvae. *Aquaculture* 420, 38–48. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.10.032
- Arnér, E.S., Holmgren, A., 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267, 6102–6109.
- Arumugan, M., Romestand, B., Torreilles, J., 2000. Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquat. Living Resour.* 13, 173–177. doi:10.1016/S0990-7440(00)00150-9
- Asahi, M., Fujii, J., Suzuki, K., Seo, H.G., Kuzuya, T., Hori, M., Tada, M., Fujii, S., Taniguchi, N., 1995. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide implication for cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 270, 21035–21039.
- Auffret, M., Oubella, R., 1995. Cytological and cytometric analysis of bivalve mollusc hemocytes. *Tech. Fish Immunol.* 4, 55–63.
- Barber, B.J., Ford, S.E., Haskin, H.H., 1988. Effects of the parasite MSX (*Haplosporidium nelsoni*) on oyster (*Crassostrea virginica*) energy metabolism. I. Condition index and relative fecundity. *J. Shellfish Res.* 7, 25–31.
- Barreira, L.A., Mudge, S.M., Bebianno, M.J., 2007. Oxidative stress in the clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) in relation to polycyclic aromatic hydrocarbon body burden. *Environ. Toxicol.* 22, 203–221.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., 2013. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R Package Version 1.
- Bathige, S., Umasuthan, N., Revathy, K.S., Lee, Y., Kim, S., Cho, M.Y., Park, M.-A., Whang, I., Lee, J., 2014. A mu class glutathione S-transferase from Manila clam *Ruditapes philippinarum* (RpGST μ): Cloning, mRNA expression, and conjugation assays. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 162, 85–95.
- Bayne, B.L., 1975. Reproduction in bivalve molluscs under environmental stress. *Physiol. Ecol. Estuar. Org.* 259–277.
- Beckman, J.S., Koppenol, W.H., 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 271, C1424–C1437.
- Béguel, J.-P., Huvet, A., Quillien, V., Lambert, C., Fabioux, C., 2013. Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 157, 63–71. doi:10.1016/j.cbpc.2012.10.004
- Beninger, P., Lucas, A., 1984. Seasonal-Variations in Condition, Reproductive Activity, and Gross Biochemical-Composition of 2 Species of Adult Clam Reared in a Common Habitat - *Tapes-Decussatus* L (jeffreys) and *Tapes-Philippinarum* (adams and Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79, 19–37. doi:10.1016/0022-0981(84)90028-5
- Beninger, P., Stephan, G., 1985. Seasonal-Variations in the Fatty-Acids of the Triacylglycerols and Phospholipids of 2 Populations of Adult Clam (*tapes-Decussatus* L and *T Philippinarum*) Reared in a Common Habitat. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 81, 591–601. doi:10.1016/0305-0491(85)90372-4
- Bernard, C., Dumas, J.-B., Bert, P., 1878. *La science expérimentale*. JB Baillière & fils.

- Bibby, R., Widdicombe, S., Parry, H., Spicer, J., Pipe, R., 2008. Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Biol.* 2, 67–74.
- Bidault, A., Richard, G., Le Bris, C., Paillard, C., submitted to PeerJ. Development of a Taqman real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio tapetis* in extrapallial fluids of clams.
- Bodoy, A., Maitre-Allain, T., Riva, A., 1980. Croissance comparée de la palourde européenne (*Ruditapes decussatus*) et de la palourde japonaise (*Ruditapes philippinarum*) dans un écosystème artificiel méditerranéen. *Vie Mar.*
- Bodoy, A., Riva, A., Maitre-Allain, T., 1986. Comparaison de la respiration chez *Ruditapes decussatus* (L.) et *R. philippinarum* (Adams & Reeve) en fonction de la température. *Vie Milieu* 36, 83–89.
- Bogdan, C., 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2, 907–916.
- Borrego, J.J., Castro, D., Luque, A., Paillard, C., Maes, P., Garcia, M.T., Ventosa, A., 1996a. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 480–484.
- Borrego, J.J., Luque, A., Castro, D., Santamaria, J.A., Martinez Manzanares, E., 1996b. Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquat. Living Resour.* 9, 125–136. doi:10.1051/alr:1996016
- Boveris, A., Cadenas, E., 2000. Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. *IUBMB Life* 50, 245–250.
- Boveris, A., Oshino, N., Chance, B., 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617–630.
- Boyd, J.N., Burnett, L.E., 1999. Reactive oxygen intermediate production by oyster hemocytes exposed to hypoxia. *J. Exp. Biol.* 202, 3135–3143.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bricelj, V.M., Ford, S.E., Lambert, C., Barbou, A., Paillard, C., 2011. Effects of toxic *Alexandrium tamarense* on behavior, hemocyte responses and development of brown ring disease in Manila clams. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 430, 35–48. doi:10.3354/meps09111
- Brulle, F., Jeffroy, F., Madec, S., Nicolas, J.-L., Paillard, C., 2012. Transcriptomic analysis of *Ruditapes philippinarum* hemocytes reveals cytoskeleton disruption after in vitro *Vibrio tapetis* challenge. *Dev. Comp. Immunol.* 38, 368–376. doi:10.1016/j.dci.2012.03.003
- Bugge, D.A., Hegaret, H., Wikfors, G.H., Allam, B., 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 188–196. doi:10.1016/j.fsi.2006.10.006
- Bulgakov, A.A., Park, K.-I., Choi, K.-S., Lim, H.-K., Cho, M., 2004. Purification and characterisation of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 487–499.
- Burreson, E.M., Ford, S.E., 2004. A review of recent information on the *Haplosporidia*, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquat. Living Resour.* 17, 499–517. doi:10.1051/alr:2004056

- Butt, D., O'Connor, S.J., Kuchel, R., O'Connor, W.A., Raftos, D.A., 2008. Effects of the muscle relaxant, magnesium chloride, on the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture* 275, 342–346.
- Butt, D., Raftos, D., 2008. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 299–306. doi:10.1016/j.dci.2007.06.006
- Butt, D., Shaddick, K., Raftos, D., 2006. The effect of low salinity on phenoloxidase activity in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Aquaculture* 251, 159–166.
- Byrne, M., 2010. Impact of climate change stressors on marine invertebrate life histories with a focus on the Mollusca and Echinodermata. *Clim. Alert Clim. Change Monit. Strategy Univ. Syd. Press Syd.* 142–185.
- Caers, M., Coutteau, P., Sorgeloos, P., 1999. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture* 170, 307–322. doi:10.1016/S0044-8486(98)00410-4
- Calabro, C., Albanese, M.P., Martella, S., Licata, P., Lauriano, E.R., Bertuccio, C., Licata, A., 2005. Glycoconjugate histochemistry and nNOS immunolocalization in the mantle and foot epithelia of *Tapes philippinarum* (bivalve mollusc). *Folia Histochem. Cytobiol.* 43, 151–150.
- Calderon-Cortes, E., Clemente-Guerrero, M., Sierra-Campos, E., Cortes-Rojo, C., Gaona-Zamudio, F.J., Villalobos-Molina, R., Saavedra-Molina, A., 2006. Functional characterization of brain mitochondrial nitric oxide synthase during hypertension and aging. *Amino Acids* 30, 73–80. doi:10.1007/s00726-005-0213-x
- Calvez, I., 2003. Approche de la variabilité d'une population de palourdes *Ruditapes Philippinarum* (Adams et Reeve), aux stades larvaires et post-larvaires. Université de Bretagne occidentale, France.
- Canesi, L., 2015. Pro-oxidant and antioxidant processes in aquatic invertebrates, in: Valacchi, G. (Ed.), *Cellular and Environmental Stressors in Biology and Medicine*. pp. 1–7.
- Canesi, L., Barmo, C., Fabbri, R., Ciacci, C., Vergani, L., Roch, P., Gallo, G., 2010. Effects of vibrio challenge on digestive gland biomarkers and antioxidant gene expression in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 152, 399–406. doi:10.1016/j.cbpc.2010.06.008
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Tech.* 57, 469–476. doi:10.1002/jemt.10100
- Cannon, W.B., 1929. Organization for physiological homeostasis. *Physiol. Rev.* 9.
- Casadevall, A., Pirofski, L.A., 1999. Host-pathogen interactions: Redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* 67, 3703–3713.
- Casas, S.M., Villalba, A., Reece, K.S., 2002. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis. Aquat. Organ.* 50, 51–65. doi:10.3354/dao050051
- Castro, D., Martinez-Manzanares, E., Luque, A., Fouz, B., Moriñigo, M.A., Borrego, J.J., Toranzo, A.E., 1992. Characterization of strains related to brown ring disease outbreaks in southwestern Spain. *Dis. Aquat. Organ.* 14, 229–236.
- Cerenius, L., Lee, B.L., Soderhall, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29, 263–271. doi:10.1016/j.it.2008.02.009

- Cerenius, L., Söderhäll, K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 116–126.
- Chávez-Villalba, J., Soye, C., Aurentz, H., Le Moullac, G., 2013. Physiological responses of female and male black-lip pearl oysters (*Pinctada margaritifera*) to different temperatures and concentrations of food. *Aquat. Living Resour.* 26, 263–271.
- Chen, G.A., Gharib, T.G., Huang, C.C., Taylor, J.M.G., Misek, D.E., Kardina, S.L.R., Giordano, T.J., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., Hanash, S.M., Beer, D.G., 2002. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 304–313. doi:10.1074/mcp.M200008-MCP200
- Cheng, T.C., 1975. FUNCTIONAL MORPHOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF MOLLUSCAN PHAGOCYTES. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 266, 343–379.
- Cheng, T.C., Guida, V.G., Gerhart, P.L., 1978. Aminopeptidase and lysozyme activity levels and serum protein concentrations in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) challenged with bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* 32, 297–302.
- Cheng, W., Chieu, H.T., Tsai, C.H., Chen, J.C., 2005. Effects of dopamine on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 375–385. doi:10.1016/j.fsi.2005.03.002
- Cheng, W., Hsiao, I.S., Hsu, C.H., Chen, J.C., 2004. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 235–243. doi:10.1016/j.fsi.2004.03.007
- Cheng, W.T., Chieu, H.T., Ho, M.C., Chen, J.C., 2006. Noradrenaline modulates the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 21, 11–19. doi:10.1016/j.fsi.2005.09.003
- Chen, M., Yang, H., Delaporte, M., Zhao, S., 2007. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge. *Aquaculture* 271, 479–487.
- Chen, S.-M., Tseng, K.-Y., Huang, C.-H., 2015. Fatty acid composition, sarcoplasmic reticular lipid oxidation, and immunity of hard clam (*Meretrix lusoria*) fed different dietary microalgae. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 141–145. doi:10.1016/j.fsi.2015.02.025
- Chew, K.K., 1989. Manila clam biology and fishery development in Western North America. *Clam Maric. N. Am. Elsevier Amst.* 243–261.
- Childress, J., Somero, G., 1979. Depth-Related Enzymic Activities in Muscle, Brain and Heart of Deep-Living Pelagic Marine Teleosts. *Mar. Biol.* 52, 273–283. doi:10.1007/BF00398141
- Cho, H., Xie, Q., Calaycay, J., Mumford, R., Swiderek, K., Lee, T., Nathan, C., 1992. Calmodulin Is a Subunit of Nitric-Oxide Synthase from Macrophages. *J. Exp. Med.* 176, 599–604. doi:10.1084/jem.176.2.599
- Choquet, G., 2004. Caractérisation et pathogénie des isolats de *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise (Thèse doctorat). Université de Bretagne occidentale, France.
- 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. doi:10.3354/dao057109
- Chu, F., Lapeyre, J., 1993. *Perkinsus-Marinus* Susceptibility and Defense-Related Activities in Eastern Oysters *Crassostrea-Virginica* - Temperature Effects. *Dis. Aquat. Organ.* 16, 223–234. doi:10.3354/dao016223

- Chu, F., Lapeyre, J., Burreson, C., 1993. *Perkinsus-Marinus* Infection and Potential Defense-Related Activities in Eastern Oysters, *Crassostrea-Virginica* - Salinity Effects. J. Invertebr. Pathol. 62, 226–232. doi:10.1006/jipa.1993.1104
- Chu, F.-L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. Recent Adv. Mar. Biotechnol. 5, 1e42.
- Chu, F.L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves.
- Chu, F.-L.E., Soudant, P., Lund, E.D., 2003. *Perkinsus marinus*, a protozoan parasite of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*): effects of temperature on the uptake and metabolism of fluorescent lipid analogs and lipase activities. Exp. Parasitol. 105, 121–130.
- Cima, F., Matozzo, V., Marin, M.G., Ballarin, L., 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. Fish Shellfish Immunol. 10, 677–693.
- Colasanti, M., Venturini, G., 1998. Nitric oxide in invertebrates. Mol. Neurobiol. 17, 157–174.
- Cong, M., Song, L., Wang, L., Zhao, J., Qiu, L., Li, L., Zhang, H., 2008. The enhanced immune protection of Zhikong scallop *Chlamys farreri* on the secondary encounter with *Listonella anguillarum*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 151, 191–196.
- Conte, A., Ottaviani, E., 1995. Nitric-Oxide Synthase Activity in Molluscan Hemocytes. Febs Lett. 365, 120–124. doi:10.1016/0014-5793(95)00439-G
- Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A., Harel, M., 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. Aquaculture 210, 285–304. doi:10.1016/S0044-8486(01)00849-3
- Corporeau, C., Tamayo, D., Pernet, F., Quéré, C., Madec, S., 2014. Proteomic signatures of the oyster metabolic response to herpesvirus OsHV-1 μ Var infection. J. Proteomics 109, 176–187.
- Corporeau, C., Vanderplancke, G., Boulais, M., Suquet, M., Quere, C., Boudry, P., Huvet, A., Madec, S., 2012. Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. J. Proteomics 75, 5554–5563. doi:10.1016/j.jprot.2012.07.040
- Costa, M.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 Shellfish Immunol. 24, 498–505. doi:10.1016/j.fsi.2007.10.003
- Costa, M.M., Prado-Álvarez, M., Gestal, C., Li, H., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A., 2009. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. Fish Shellfish Immunol. 26, 515–523.
- Cribb, A., Leeder, J., Spielberg, S., 1989. Use of a Microplate Reader in an Assay of Glutathione-Reductase Using 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoic Acid). Anal. Biochem. 183, 195–196. doi:10.1016/0003-2697(89)90188-7
- Da Costa, F., Novoa, S., Ojea, J., Martinez-Patino, D., 2012. Effects of algal diets and starvation on growth, survival and fatty acid composition of *Solen marginatus* (Bivalvia: Solenidae) larvae. Sci. Mar. 76, 527–537. doi:10.3989/scimar.03470.18A
- Dahl, S.F., Perrigault, M., Liu, Q., Collier, J.L., Barnes, D.A., Allam, B., 2011. Effects of temperature on hard clam (*Mercenaria mercenaria*) immunity and QPX (Quahog

- Parasite Unknown) disease development: I. Dynamics of QPX disease. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 314–321. doi:10.1016/j.jip.2010.11.005
- Dalsgaard, J., St John, M., Kattner, G., Muller-Navarra, D., Hagen, W., 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Adv. Mar. Biol.* Vol 46 46, 225–340. doi:10.1016/S0065-2881(03)46005-7
- Dang, C., de Montaudouin, X., Gam, M., Paroissin, C., Bru, N., Caill-Milly, N., 2010. The Manila clam population in Arcachon Bay (SW France): Can it be kept sustainable? *J. Sea Res.* 63, 108–118. doi:10.1016/j.seares.2009.11.003
- Daou, R., Gouletquer, P., 1988. Effets de la turbidité sur les palourdes adultes *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve): croissance, mortalité, effort de reproduction, composition biochimique. *Océanis* 14, 375–389.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Jegaden, M., Moal, J., Pouvreau, S., Degremont, L., Boudry, P., Samain, J.-F., 2007. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 353, 45–57. doi:10.1016/j.jembe.2007.09.003
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Segueineau, C., Samain, J.-F., 2006. Impact of 20 : 4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Lipids* 41, 567–576. doi:10.1007/s11745-006-5006-9
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Kraffe, E., Marty, Y., Samain, J.F., 2005. Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comp. Biochem. Physiol. -Mol. Integr. Physiol.* 140, 460–470. doi:10.1016/j.cbpb.2005.02.009
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quere, 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*. *J. Exp. Biol.* 206, 3053–3064. doi:10.1242/jeb.00518
- Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J., Samain, J., 1993. The Effect of Monospecific Algal Diets on Growth and Fatty-Acid Composition of *Pecten-Maximus* (l) Larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 173, 163–179. doi:10.1016/0022-0981(93)90051-O
- Development Core Team, R., 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing.
- Donaghy, L., Hong, H.-K., Jauzein, C., Choi, K.-S., 2015. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 91–97. doi:10.1016/j.fsi.2014.10.030
- Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goïc, N., Lambert, C., Volety, A.K., Soudant, P., 2012. Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement.
- 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. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.09.003
- 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. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.01.052

- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. doi:10.1021/ac60111a017
- Dubuisson, M., Vander Stricht, D., Clippe, A., Etienne, F., Nauser, T., Kissner, R., Koppenol, W.H., Rees, J.-F., Knoops, B., 2004. Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Lett.* 571, 161–165.
- Dudognon, T., Lambert, C., Quere, C., Auffret, M., Soudant, P., Kraffe, E., 2014. Mitochondrial activity, hemocyte parameters and lipid composition modulation by dietary conditioning in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Comp. Physiol. B-Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 184, 303–317. doi:10.1007/s00360-013-0800-1
- Ellis, R.P., Parry, H., Spicer, J.I., Hutchinson, T.H., Pipe, R.K., Widdicombe, S., 2011. Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 1209–1222. doi:10.1016/j.fsi.2011.03.017
- Elston, R.A., Cheney, D.P., MacDonald, B.F., Suhrbier, A.D., 2003. Tolerance and response of Manila clams, *Venerupis philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) to low salinity. *J. Shellfish Res.* 22, 667–674.
- Epelboin, Y., Quéré, C., Pernet, F., Pichereau, V., Corporeau, C., 2015. Energy and antioxidant responses of Pacific oyster exposed to trace levels of pesticides. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 1831–1841.
- Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J., Haure, J., 2004. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *J. Evol. Biol.* 17, 342–356. doi:10.1046/j.1420-9101.2003.00674.x
- Faisal, M., MacIntyre, E.A., Adham, K.G., Tall, B.D., Kothary, M.H., La Peyre, J., 1998. Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 121, 161–168.
- Fanjul-Moles, M.L., Duran-Lizarraga, E., Gonsebatt, M.E., Prieto-Sagredo, J., 2003. The effect of photoperiod and light irradiance on the antioxidant circadian system of two species of crayfish from different latitudes: *Procambarus clarkii* and a *P-digueti*. *Photochem. Photobiol.* 77, 210–218.
- FAO, 2013. Fisheries Statistics - Aquaculture [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en> (accessed 11.10.15).
- Faria, J.C., 2014. TukeyC: Conventional Tukey Test.
- Fernandez-Reiriz, M.-J., Luis Garrido, J., Irisarri, J., 2015. Fatty acid composition in *Mytilus galloprovincialis* organs: trophic interactions, sexual differences and differential anatomical distribution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 528, 221–234. doi:10.3354/meps11280
- Fernández-Reiriz, M.J., Navarro, J.M., Contreras, A.M., Labarta, U., 2008. Trophic interactions between the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Mytilus chilensis*: Feeding and digestive behaviour to long-term exposure. *Aquat. Toxicol.* 87, 245–251.
- Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., Delgado, M., Labarta, U., 2007. Dynamics of biochemical components, lipid classes and energy values on gonadal development of *R. philippinarum* associated with the temperature and ingestion rate. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 147, 1053–1059.
- Flassch, J.-P., 1988. La palourde. Dossier d'élevage.
- Flassch, J.-P., Barret, J., Mazurie, J., Maes, P., Nicolas, J., Noel, T., Paillard, C., Lepennec, M., 1992. L'élevage de la palourde, programme national de recherche sur la maladie de

- l'anneau brun, in: Les Mollusques Marins: Biologie et Aquaculture, Brest (France), 9 Nov 1990.
- Flassch, J.-P., Leborgne, Y., 1992. Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and the effects on aquaculture production and natural settlement. Presented at the Introductions and Transfers of Aquatic species. Selected papers from a Symposium Held in Halifax, Nova Scotia, 12-13 June 1990.
- Flye-Sainte-Marie, J., Jean, F., Ford, S.E., Paillard, C., 2008. Effect of sediment grain-size on development of brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 278, 184–187. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.03.013
- Flye-Sainte-Marie, J., Jean, F., Paillard, C., Kooijman, S.A.L.M., 2009a. A quantitative estimation of the energetic cost of brown ring disease in the Manila clam using Dynamic Energy Budget theory. *J. Sea Res.* 62, 114–123. doi:10.1016/j.seares.2009.01.007
- Flye-Sainte-Marie, J., Pouvreau, S., Paillard, C., Jean, F., 2007. Impact of Brown Ring Disease on the energy budget of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 349, 378–389. doi:10.1016/j.jembe.2007.05.029
- Flye-Sainte-Marie, J., Soudant, P., Lambert, C., Le Goic, N., Goncalvez, M., Travers, M.-A., Paillard, C., Jean, F., 2009b. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 377, 1–11. doi:10.1016/j.jembe.2009.06.003
- Fox, J., Weisberg, S., 2010. An R Companion to Applied Regression. SAGE.
- Franchini, A., Fontanili, P., Ottaviani, E., 1995. Invertebrate immunocytes: relationship between phagocytosis and nitric oxide production. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 110, 403–407.
- Fridovich, I., 1975. Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 147–159.
- Gagnaire, B., Gay, M., Huvet, A., Daniel, J.-Y., Saulnier, D., Renault, T., 2007. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *in vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquat. Toxicol.* 84, 92–102.
- Gagnaire, B., Soletchnik, P., Madec, P., Geairon, P., Le Moine, O., Renault, T., 2006. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture* 254, 606–616.
- Genard, B., Miner, P., Nicolas, J.-L., Moraga, D., Boudry, P., Pernet, F., Tremblay, R., 2013. Integrative Study of Physiological Changes Associated with Bacterial Infection in Pacific Oyster Larvae. *Plos One* 8, e64534. doi:10.1371/journal.pone.0064534
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J., 2002. Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Mar. Environ. Res.* 54, 413–417.
- Gosling, E., 2008. Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. John Wiley & Sons.
- Gouletquer, P., 1997. A bibliography of the Manila clam *Tapes philippinarum*.
- Gouletquer, P., Heral, M., Deslous-Paoli, J.M., Prou, J., Garnier, J., Razet, D., Boromthanarat, W., 1989. Ecophysiologie et bilan énergétique de la palourde japonaise d'élevage *Ruditapes philippinarum*. *J. Expérimental Mar. Biol. Ecol.* 132, 85–108.
- Gouletquer, P., Nedhif, M., Heral, M., 1988. Production de palourdes japonaises *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve) en bassin semi-fermé: Approche énergétique et relations trophiques. *Aquaculture* 74, 331–348. doi:10.1016/0044-8486(88)90377-8

- Gouletquer, P., Université de Bretagne occidentale, 1989. Etude des facteurs environnementaux intervenant sur la production de la palourde japonaise d'élevage *Ruditapes philippinarum*. [s.n.], [S.l.].
- Gourdon, I., Guérin, M.-C., Torreilles, J., 1998. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse aux stress chez les bivalves marins. *Comptes Rendus Séances Société Biol. Ses Fil.* 192, 749–774.
- Gourdon, I., Guerin, M.C., Torreilles, J., Roch, P., 2001. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide-Biol. Chem.* 5, 1–6. doi:10.1006/niox.2000.0327
- Greenway, S.C., Storey, K.B., 1999. The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 242, 259–272. doi:10.1016/S0022-0981(99)00103-3
- Gross, S.S., 1996. Microtiter plate assay for determining kinetics of nitric oxide synthesis. *Nitric Oxide Pt - Sources Detect. No No Synthase* 268, 159–168.
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goic, N., Moal, J., Suquet, M., Gueguen, M., Sunila, I., Soudant, P., 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* 9, 427–439. doi:10.1016/j.hal.2010.01.003
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., others, 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford university press Oxford.
- Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., Cadenas, E., 2003. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol. Chem.* 278, 5557–5563.
- Hausladen, A., Gow, A.J., Stamler, J.S., 1998. Nitrosative stress: Metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14100–14105. doi:10.1073/pnas.95.24.14100
- Hausladen, A., Stamler, J.S., 1999. Nitrosative stress. *Oxid. Antioxid. Pt B* 300, 389–395.
- Hégaret, H., da Silva, P.M., Sunila, I., Shumway, S.E., Dixon, M.S., Alix, J., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2009. Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 371, 112–120. doi:10.1016/j.jembe.2009.01.016
- Hégaret, H., Smolowitz, R.M., Sunila, I., Shumway, S.E., Alix, J., Dixon, M., Wikfors, G.H., 2010. Combined effects of a parasite, QPX, and the harmful-alga, *Prorocentrum minimum* on northern quahogs, *Mercenaria mercenaria*. *Mar. Environ. Res.* 69, 337–344. doi:10.1016/j.marenvres.2009.12.008
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293, 249–265.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., Delaporte, M., Alix, J.H., Smith, B.C., Dixon, M.S., Quere, C., Le Coz, J.R., Paillard, C., others, 2004. Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. *Aquaculture* 234, 541–560.
- Heise, K., Puntarulo, S., Pörtner, H.-O., Abele, D., 2003. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 134, 79–90.

- Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 433–440.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves: a practical manual. Food and agriculture organization of the United Nations.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals, in: Ph.D, K.B.S. (Ed.), *Functional Metabolism*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 319–368.
- Holmblad, T., Söderhäll, K., 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172, 111–123.
- Howard, D.W., Smith, C.S., Center, N.F., 1983. *Histological techniques for marine bivalve mollusks*.
- Hulbert, A.J., 2003. Life, death and membrane bilayers. *J. Exp. Biol.* 206, 2303–2311.
- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., Boudry, P., 2010. Reproductive effort of Pacific oysters: A trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture* 304, 95–99. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.03.022
- Isani, G., Cattani, O., Zurzolo, M., Pagnucco, C., Cortesi, P., 1995. Energy metabolism of the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, during long-term anoxia. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 110, 103–113.
- Itoh, N., Takahashi, K.G., 2009. A novel peptidoglycan recognition protein containing a goose-type lysozyme domain from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mol. Immunol.* 46, 1768–1774.
- Janeway, C.A., 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology, in: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1–13.
- Jeffroy, F., 2011. Production et caractérisation de familles de palourdes japonaises, *Ruditapes philippinarum*, résistantes à la maladie de l’anneau brun. Université de Bretagne occidentale-Brest.
- Jeffroy, F., Brulle, F., Paillard, C., 2013. Differential expression of genes involved in immunity and biomineralization during Brown Ring Disease development and shell repair in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *J. Invertebr. Pathol.* 113, 129–136. doi:10.1016/j.jip.2013.03.001
- 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 Shellfish Immunol.* 31, 1137–1141. doi:10.1016/j.fsi.2011.10.008
- Jensen, S., Samuelsen, O.B., Andersen, K., Torkildsen, L., Lambert, C., Choquet, G., Paillard, C., Bergh, O., 2003. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V-tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Dis. Aquat. Organ.* 53, 25–31. doi:10.3354/dao053025
- Jiang, Q., Zhou, Z., Wang, L., Yang, C., Wang, J., Wu, T., Song, L., 2014. Mutual modulation between norepinephrine and nitric oxide in haemocytes during the mollusc immune response. *Sci. Rep.* 4.
- Johansson, M.W., Holmblad, T., Thornqvist, P.-O., Cammarata, M., Parrinello, N., Soderhall, K., 1999. A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell-adhesive peroxidase in crayfish. *J. Cell Sci.* 112, 917–925.
- Kang, Y.-S., Kim, Y.-M., Park, K.-I., Cho, S.K., Choi, K.-S., Cho, M., 2006. Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*)(Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 1119–1131.

- Kim, J.Y., Adhya, M., Cho, S.K., Choi, K.S., Cho, M., 2008a. Characterization, tissue expression, and immunohistochemical localization of MCL3, a C-type lectin produced by *Perkinsus olseni*-infected Manila clams (*Ruditapes philippinarum*). *Fish Shellfish Immunol.* 25, 598–603.
- Kim, J.Y., Kim, Y.M., Cho, S.K., Choi, K.S., Cho, M., 2008b. Noble tandem-repeat galectin of Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1131–1141.
- Kim, W.S., Huh, H.T., Lee, J.-H., Rumohr, H., Koh, C.H., 1999. Endogenous circatidal rhythm in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Mar. Biol.* 134, 107–112.
- Kletzien, R.F., Harris, P.K., Foellmi, L.A., 1994. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J.* 8, 174–181.
- Knipp, M., Vasak, M., 2000. A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline. *Anal. Biochem.* 286, 257–264. doi:10.1006/abio.2000.4805
- Knowles, R., Moncada, S., 1994. Nitric-Oxide Synthases in Mammals. *Biochem. J.* 298, 249–258.
- Kotsyuba, E.P., 2009. Effects of temperature stress on NO-synthase and tyrosine hydroxylase activities in the central nervous system of bivalve molluscs. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 45, 138–146.
- Kuchel, R.P., Aladaileh, S., Birch, D., Vella, N., Raftos, D.A., 2010. Phagocytosis of the protozoan parasite, *Marteilia sydneyi*, by Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 104, 97–104.
- Kültz, D., 2005. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol* 67, 225–257.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Gonçalves, M., Lambert, C., Nicolas, J.-L., 2006. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 367–379.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Cueff, A., Jalabert, F., Gélébart, F., Poulet, S.A., 2001a. Evidence for a form of adrenergic response to stress in the mollusc *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Biol.* 204, 1247–1255.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Cueff, A., Poulet, S.A., 2001b. Noradrenaline modulates hemocyte reactive oxygen species production via β -adrenergic receptors in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 285–289.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Cueff, A., Poulet, S.A., 2001c. Noradrenaline modulates oyster hemocyte phagocytosis via a β -adrenergic receptor–cAMP signaling pathway. *Gen. Comp. Endocrinol.* 122, 252–259.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Gélébart, F., Cueff, A., Poulet, S.A., 2002. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 1–9.
- Laing, I., 1993. The response of Manila clam, *Tapes philippinarum*, juveniles to nutritive stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 173, 111–121.
- Laing, I., Child, A.R., 1996. Comparative tolerance of small juvenile palourdes (*Tapes decussatus* L.) and Manila clams (*Tapes philippinarum* Adams & Reeve) to low temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 195, 267–285.

- 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 Shellfish Immunol.* 15, 225–240. doi:10.1016/S1050-4648(02)00160-2
- Lambert, C., Soudant, P., Dégremont, L., Delaporte, M., Moal, J., Boudry, P., Jean, F., Huvet, A., Samain, J.-F., 2007a. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture* 270, 276–288.
- Lambert, C., Soudant, P., Jegaden, M., Delaporte, M., Labreuche, Y., Moal, J., Samain, J.-F., 2007b. *In vitro* modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in *Crassostrea gigas* hemocytes. *Aquaculture* 270, 413–421.
- Lang, R.P., Bayne, C.J., Camara, M.D., Cunningham, C., Jenny, M.J., Langdon, C.J., 2009. Transcriptome profiling of selectively bred Pacific oyster *Crassostrea gigas* families that differ in tolerance of heat shock. *Mar. Biotechnol.* 11, 650–668.
- 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*. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 84–92.
- La Peyre, M.K., Casas, S.M., Gayle, W., La Peyre, J.F., 2010. The combined influence of sub-optimal temperature and salinity on the in vitro viability of *Perkinsus marinus*, a protistan parasite of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 176–181.
- Laruelle, F., 1999. Phénologie et déterminisme de la reproduction chez *Ruditapes decussatus* (L.) et *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve) en Bretagne. Université de Bretagne occidentale, France.
- Laruelle, F., Guillou, J., Paulet, Y., 1994. Reproductive Pattern of the Clams, *Ruditapes-Decussatus* and *R-Philippinarum* on Intertidal Flats in Brittany. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 74, 351–366.
- Lassudrie, M., Soudant, P., Richard, G., Henry, N., Medhioub, W., da Silva, P.M., Donval, A., Bunel, M., Le Goic, N., Lambert, C., de Montaudouin, X., Fabioux, C., Hegaret, H., 2014. Physiological responses of Manila clams *Venerupis (=Ruditapes) philippinarum* with varying parasite *Perkinsus olseni* burden to toxic algal *Alexandrium ostenfeldii* exposure. *Aquat. Toxicol.* 154, 27–38. doi:10.1016/j.aquatox.2014.05.002
- Lawrence, R., Burk, R., 1976. Glutathione Peroxidase-Activity in Selenium-Deficient Rat-Liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952–958. doi:10.1016/0006-291X(76)90747-6
- Le Bris, C., 2013. Le système phénoloxydase : caractérisation biochimique et rôle dans la réponse immunitaire chez la palourde japonaise *Venerupis philippinarum* exposée à *Vibrio tapetis* (PhD thesis). Université de Bretagne occidentale - Brest.
- Le Bris, C., Paillard, C., Stiger-Pouvreau, V., Guerard, F., 2013. Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum*: Characterization and kinetic properties. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1804–1812. doi:10.1016/j.fsi.2013.09.009
- Le Bris, C., Richard, G., Paillard, C., Lambert, C., Seguineau, C., Gauthier, O., Pernet, F., Guerard, F., 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* - Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 16–24. doi:10.1016/j.fsi.2014.10.021
- Lelong, C., Badariotti, F., Le Quere, H., Rodet, F., Dubos, M.P., Favrel, P., 2007. Cg-TGF- β , a TGF- β /activin homologue in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*, is involved in

- immunity against Gram-negative microbial infection. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 30–38.
- Le Pennec, M., 1978. Génèse de la coquille larvaire et postlarvaire chez divers bivalves marins.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology, in: *Annual Review of Physiology*. pp. 253–278.
- Letendre, J., Chouquet, B., Rocher, B., Manduzio, H., Leboulenger, F., Durand, F., 2008. Differential pattern of Cu/Zn superoxide dismutase isoforms in relation to tidal spatio-temporal changes in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 148, 211–216. doi:10.1016/j.cbpc.2008.05.012
- Li, C., Sun, H., Chen, A., Ning, X., Wu, H., Qin, S., Xue, Q., Zhao, J., 2010. Identification and characterization of an intracellular Cu, Zn-superoxide dismutase (icCu/Zn-SOD) gene from clam *Venerupis philippinarum*. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 499–503.
- Lin, C.-M., Lin, Y.-L., Tsai, N.-M., Wu, H.-Y., Ho, S.-Y., Chen, C.-H., Liu, Y.-K., Chiu, Y.-H., Ho, L.-P., Lee, R.-P., Liao, K.-W., 2012. Inhibitory Effects of Chloroform Extracts Derived from *Corbicula fluminea* on the Release of Pro-inflammatory Cytokines. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4076–4082. doi:10.1021/jf2051202
- Lin, T., Xing, J., Jiang, J., Tang, X., Zhan, W., 2011. β -glucan-stimulated activation of six enzymes in the haemocytes of the scallop *Chlamys farreri* at different water temperatures. *Aquaculture* 315, 213–221.
- Lin, X., Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2007. Purification of properoxinectin, a myeloperoxidase homologue and its activation to a cell adhesion molecule. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* 1770, 87–93.
- Lopez-Cortes, L., Castro, D., Navas, J.I., Borrego, J.J., 1999. Phagocytic and chemotactic responses of manila and carpet shell clam haemocytes against *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 543–555. doi:10.1006/fsim.1999.0211
- 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). *Res. Vet. Sci.* 90, 189–195. doi:10.1016/j.rvsc.2010.05.030
- Lucas, A., Beninger, P., 1985. The Use of Physiological Condition Indexes in Marine Bivalve Aquaculture. *Aquaculture* 44, 187–200. doi:10.1016/0044-8486(85)90243-1
- Luna-Acosta, A., Renault, T., Thomas-Guyon, H., Faury, N., Saulnier, D., Budzinski, H., Le Menach, K., Pardon, P., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., 2012. Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofen) on immunological parameters of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Chemosphere* 87, 1335–1340. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.02.022
- Luna-Acosta, A., Saulnier, D., Pommier, M., 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 Shellfish Immunol.* 31, 795–800. doi:10.1016/j.fsi.2011.07.016
- Lu, Y., Zhang, P., Li, C., Su, X., Jin, C., Li, Y., Xu, Y., Li, T., 2013. Characterisation of immune-related gene expression in clam (*Venerupis philippinarum*) under exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 142–146.

- Madec, S., Pichereau, V., Jacq, A., Paillard, M., Boisset, C., Guerard, F., Paillard, C., Nicolas, J.-L., 2014. Characterization of the Secretomes of Two *Vibrios* Pathogenic to Mollusks. *Plos One* 9, e113097. doi:10.1371/journal.pone.0113097
- Maes, P., Paillard, C., 1992. Effect du *Vibrio* P1, pathogene de *Ruditapes philippinarum*, sur d'autres especes de bivalves, in: Les Mollusques Marins: Biologie et Aquaculture, Brest (France), 9 Nov 1990.
- Magoon, C., Vining, R., 1981. Introduction to shellfish aquaculture. Rep. Wash. Dep. Nat. Resour.
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, W., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.* 70, 83–93. doi:10.1016/j.aquatox.2004.07.033
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Rocher, W., Leboulenger, F., Galap, C., 2003. Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 64, 73–83. doi:10.1016/S0166-445X(03)00026-2
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ* 2.
- Mann, R., 1979. The effect of temperature on growth, physiology, and gametogenesis in the Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 38, 121–133.
- Marty, Y., Delaunay, F., Moal, J., Samain, J., 1992. Changes in the Fatty-Acid Composition of *Pecten-Maximus* (l) During Larval Development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163, 221–234. doi:10.1016/0022-0981(92)90051-B
- Mat, A., 2012. Étude des rythmes biologiques de l'huître *Crassostrea gigas* et de leur perturbation par l'algue toxique *Alexandrium minutum*. Bordeaux 1.
- Mat, A.M., Massabuau, J.-C., Ciret, P., Tran, D., 2012. Evidence for a plastic dual circadian rhythm in the oyster *Crassostrea gigas*. *Chronobiol. Int.* 29, 857–867.
- Matozzo, V., Chinellato, A., Munari, M., Bressan, M., Marin, M.G., 2013. Can the combination of decreased pH and increased temperature values induce oxidative stress in the clam *Chamelea gallina* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Mar. Pollut. Bull.* 72, 34–40. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.05.004
- Matozzo, V., Chinellato, A., Munari, M., Finos, L., Bressan, M., Marin, M.G., 2012. First evidence of immunomodulation in bivalves under seawater acidification and increased temperature. *PloS One* 7, e33820.
- Matozzo, V., Monari, M., Foschi, J., Papi, T., Cattani, O., Marin, M.G., 2005. Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina*: I. Effects on immune responses. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 325, 163–174.
- Matozzo, V., Monari, M., Foschi, J., Serrazanetti, G.P., Cattani, O., Marin, M.G., 2007. Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I: alterations in immune responses. *Mar. Biol.* 151, 1051–1058.
- Matsuyama, T., Sakai, T., Kiryu, I., Yuasa, K., Yasunobu, H., Kawamura, Y., Sano, M., 2010. First Isolation of *Vibrio tapetis*, the Etiological Agent of Brown Ring Disease (BRD), in Manila Clam *Ruditapes philippinarum* in Japan. *Fish Pathol.* 45, 77–79.
- McBride, A.G., Borutaite, V., Brown, G.C., 1999. Superoxide dismutase and hydrogen peroxide cause rapid nitric oxide breakdown, peroxynitrite production and

- subsequent cell death. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* 1454, 275–288. doi:10.1016/S0925-4439(99)00046-0
- McFarland, V.A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., McCant, D.D., 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 236–241.
- Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A., 1961. The Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas Chromatographic Analysis. *Anal. Chem.* 33, 363–364. doi:10.1021/ac60171a016
- Mitta, G., Hubert, F., Noel, T., Roch, P., 1999a. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.* 265, 71–78. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00654.x
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Roch, P., 1999b. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci.* 112, 4233–4242.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M., Roch, P., 2000a. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.* 275, 12954–12962. doi:10.1074/jbc.275.17.12954
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Noel, T., Romestand, B., Beauvillain, J.C., Salzet, M., Roch, P., 2000b. Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. *J. Cell Sci.* 113, 2759–2769.
- Monari, M., Matozzo, V., Foschi, J., Cattani, O., Serrazanetti, G.P., Marin, M.G., 2007. Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 98–114. doi:10.1016/j.fsi.2006.03.016
- Monari, M., Matozzo, V., Foschi, J., Marin, M.G., Cattani, O., 2005. Exposure to anoxia of the clam, *Chamelea gallina* II: Modulation of superoxide dismutase activity and expression in haemocytes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 325, 175–188. doi:10.1016/j.jembe.2005.05.001
- Montes, J., Durfort, M., Garciavalero, J., 1995a. Characterization and Localization of an Mr-225-Kda Polypeptide Specifically Involved in the Defense-Mechanisms of the Clam *Tapes-Semidecussatus*. *Cell Tissue Res.* 280, 27–37. doi:10.1007/BF00304508
- Montes, J., Durfort, M., Garciavalero, J., 1995b. Cellular Defense-Mechanism of the Clam *Tapes Semidecussatus* Against Infection by the Protozoan *Perkinsus Sp.* *Cell Tissue Res.* 279, 529–538. doi:10.1007/s004410050312
- Moran, A.L., Manahan, D.T., 2004. Physiological recovery from prolonged “starvation” in larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 306, 17–36. doi:10.1016/j.jembe.2003.12.021
- Munro, D., Blier, P.U., 2012. The extreme longevity of *Arctica islandica* is associated with increased peroxidation resistance in mitochondrial membranes. *Aging Cell* 11, 845–855.
- Mydlarz, L.D., Jones, L.E., Harvell, C.D., 2006. Innate immunity environmental drivers and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37, 251–288. doi:10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110103
- Napolitano, G., Ackman, R., 1992. Anatomical Distributions and Temporal Variations of Lipid Classes in Sea Scallops *Placopecten-Magellanicus* (gmelin) from Georges Bank (nova-Scotia). *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 103, 645–650. doi:10.1016/0305-0491(92)90384-4

- Nappi, A., Poirié, M., Carton, Y., 2009. The Role of Melanization and Cytotoxic By-Products in the Cellular Immune Responses of *Drosophila* Against Parasitic Wasps. *Adv. Parasitol.* 70, 99–121.
- Nasci, C., Da Ros, L., Nesto, N., Sperti, L., Passarini, F., Pavoni, B., 2000. Biochemical and histochemical responses to environmental contaminants in clam, *Tapes philippinarum*, transplanted to different polluted areas of Venice Lagoon, Italy. *Mar. Environ. Res.* 50, 425–430.
- Naylor, E., 2010. *Chronobiology of marine organisms*. Cambridge University Press.
- Novas, A., Barcia, R., Ramos-Martinez, J.I., 2007. Nitric oxide production by haemocytes from *Mytilus galloprovincialis* shows seasonal variations. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 886–891. doi:10.1016/j.fsi.2007.04.007
- 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. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 390–394. doi:10.1016/S1357-2725(03)00212-7
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O’Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2015. *vegan: Community Ecology Package*.
- Olsen, Ø.M., Nilsen, I.W., Sletten, K., Myrnes, B., 2003. Multiple invertebrate lysozymes in blue mussel (*Mytilus edulis*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 136, 107–115.
- Ottaviani, E., 2006. Molluscan immunorecognition. *Inv Surv J* 3, 50–63.
- Ottaviani, E., Caselgrandi, E., Franchini, A., Franceschi, C., 1993. Crf Provokes the Release of Norepinephrine by Hemocytes of *Viviparus-Ater* (gastropoda, Prosobranchia) - Further Evidence in Favor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 446–452. doi:10.1006/bbrc.1993.1644
- Ottaviani, E., Franceschi, C., 1998. A new theory on the common evolutionary origin of natural immunity, inflammation and stress response: the invertebrate phagocytic immunocyte as an eye-witness. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15, 291–296. doi:10.1016/S0739-7240(98)00021-6
- Ottaviani, E., Franceschi, C., 1996. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. *Prog. Neurobiol.* 48, 421–440.
- Ottaviani, E., Malagoli, D., Franceschi, C., 2007. Common evolutionary origin of the immune and neuroendocrine systems: from morphological and functional evidence to in silico approaches. *TRENDS Immunol.* 28, 497–502.
- Oubella, R., Maes, P., Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 1996. Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). *Aquat. Living Resour.* 9, 137–143. doi:10.1051/alr:1996017
- Oubella, R., Maes, P., Paillard, C., Auffret, M., 1993. Experimentally-Induced Variation in Hemocyte Density for *Ruditapes-Philippinarum* and *R-Decussatus* (mollusca, Bivalvia). *Dis. Aquat. Organ.* 15, 193–197. doi:10.3354/dao015193
- Oubella, R., Paillard, C., Maes, P., Auffret, M., 1994. Changes in Hemolymph Parameters in the Manila Clam *Ruditapes-Philippinarum* (mollusca, Bivalvia) Following Bacterial Challenge. *J. Invertebr. Pathol.* 64, 33–38. doi:10.1006/jipa.1994.1065
- Paillard, C., 2004a. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Living Resour.* 17, 467–475. doi:10.1051/alr:2004053

- Paillard, C., 2004b. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Habilit. À Dir. Rech. HDR Univ. Bretagne Occident. Brest.
- Paillard, C., 1992. Etiologie et caractérisation de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'élevage *Ruditapes philippinarum* (PhD thesis). Université de Bretagne occidentale, France.
- Paillard, C., Allam, B., Oubella, R., 2004a. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Dis. Aquat. Organ. 59, 249–262. doi:10.3354/dao059249
- Paillard, C., Jean, F., Ford, S.E., Powell, E.N., Klinck, J.M., Hofmann, E.E., Flye-Sainte-Marie, J., 2014. A theoretical individual-based model of Brown Ring Disease in Manila clams, *Venerupis philippinarum*. J. Sea Res. 91, 15–34. doi:10.1016/j.seares.2014.03.005
- Paillard, C., Le Pennec, M., 1993. Ultrastructural studies of the mantle and the periostracal lamina in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Tissue Cell 25, 183–194.
- Paillard, C., Le Roux, F., Borrego, J.J., 2004b. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. Aquat. Living Resour. 17, 477–498. doi:10.1051/alr:2004054
- Paillard, C., Maes, P., 1995a. The Brown Ring Disease in the Manila Clam, *Ruditapes-Philippinarum* .1. Ultrastructural Alterations of the Periostracal Lamina. J. Invertebr. Pathol. 65, 91–100. doi:10.1006/jipa.1995.1015
- Paillard, C., Maes, P., 1995b. The Brown Ring Disease in the Manila Clam, *Ruditapes-Philippinarum* .2. Microscopic Study of the Brown Ring Syndrome. J. Invertebr. Pathol. 65, 101–110. doi:10.1006/jipa.1995.1016
- Paillard, C., Maes, P., 1994. Brown Ring Disease in the Manila Clam *Ruditapes-Philippinarum* - Establishment of a Classification-System. Dis. Aquat. Organ. 19, 137–146. doi:10.3354/dao019137
- Paillard, C., Maes, P., 1990. Etiology of the Brown Ring Disease in *Tapes-Philippinarum* - Pathogenicity of a *Vibrio Sp.* Comptes Rendus Acad. Sci. Ser. Iii-Sci. Vie-Life Sci. 310, 15–20.
- Paillard, C., Maes, P., Mazurié, J., Claude, S., Marhic, A., Le Pennec, M., 1997. Epidemiological survey of the brown ring disease in clams of Atlantic coast: role of temperature in variations of prevalence, in: Proceedings of VIIIe Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics. p. 32.
- Paillard, C., Maes, P., Oubella, R., 1994. Brown ring disease in clams. Annu. Rev. Fish Dis. 4, 219–240.
- Paillard, C., Percelay, L., Le Pennec, M., Le Picard, D., 1989. Origine pathogène de l'«anneau brun» chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). Comptes Rendus Académie Sci. Sér. 3 Sci. Vie 309, 235–241.
- Pampanin, D.M., Ballarin, L., Carotenuto, L., Marin, M.G., 2002. Air exposure and functionality of *Chamelea gallina* haemocytes: effects on haematocrit, adhesion, phagocytosis and enzyme contents. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 131, 605–614.
- Pamplona, R., Costantini, D., 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol. 301, R843–R863.

- 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. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 212–219. doi:10.1016/j.jip.2008.06.004
- Paulet, Y.-M., Donval, A., Bekhadra, F., 1993. Monoamines and reproduction in *Pecten maximus*, a preliminary approach. *Invertebr. Reprod. Dev.* 23, 89–94. doi:10.1080/07924259.1993.9672299
- Paul-Pont, I., de Montaudouin, X., Gonzalez, P., Jude, F., Raymond, N., Paillard, C., Baudrimont, M., 2010. Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the introduced marine bivalve *Ruditapes philippinarum* in European populations. *Environ. Pollut.* 158, 3401–3410. doi:10.1016/j.envpol.2010.07.028
- Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Corporeau, C., Degremont, L., Lagarde, F., Pepin, J.-F., Keck, N., 2012. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquac. Environ. Interact.* 2, 215–237.
- Pernet, F., Barret, J., Marty, C., Moal, J., Le Gall, P., Boudry, P., 2010. Environmental anomalies, energetic reserves and fatty acid modifications in oysters coincide with an exceptional mortality event. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 401, 129–146.
- Pernet, F., Lagarde, F., Jeannée, N., Daigle, G., Barret, J., Le Gall, P., Quere, C., D'orbcastel, E.R., 2014. Spatial and temporal dynamics of mass mortalities in oysters is influenced by energetic reserves and food quality. *PloS One* 9, e88469.
- Pernet, F., Tremblay, R., 2004. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 310, 73–86. doi:10.1016/j.jembe.2004.04.001
- Pernet, F., Tremblay, R., Langdon, C., Bourget, E., 2004. Effect of additions of dietary triacylglycerol microspheres on growth, survival, and settlement of mussel (*Mytilus* sp.) larvae. *Mar. Biol.* 144, 693–703. doi:10.1007/s00227-003-1234-1
- Pernet, F., Tremblay, R., Redjah, I., Sevigny, J.-M., Gionet, C., 2008. Physiological and biochemical traits correlate with differences in growth rate and temperature adaptation among groups of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Exp. Biol.* 211, 969–977. doi:10.1242/jeb.014639
- Perrigault, M., Dahl, S.F., Espinosa, E.P., Allam, B., 2012. Effects of salinity on hard clam (*Mercenaria mercenaria*) defense parameters and QPX disease dynamics. *J. Invertebr. Pathol.* 110, 73–82. doi:10.1016/j.jip.2012.02.004
- Perrigault, M., Dahl, S.F., Espinosa, E.P., Gambino, L., Allam, B., 2011. Effects of temperature on hard clam (*Mercenaria mercenaria*) immunity and QPX (Quahog Parasite Unknown) disease development: II. Defense parameters. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 322–332. doi:10.1016/j.jip.2010.11.004
- 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, 377. doi:10.1186/1471-2164-10-377
- Peters, R., Raftos, D.A., 2003. The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture* 223, 29–39.
- Pipe, R., Coles, J., 1995. Environmental Contaminants Influencing Immune Function in Marine Bivalve Mollusks. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 581–595. doi:10.1016/S1050-4648(95)80043-3

- Plana, S., 1995. Perturbations de la glande digestive et du métabolisme chez la palourde aquacole, *Ruditapes Philippinarum*, affectée par la maladie de l'anneau brun (PhD thesis). Université de Bretagne occidentale, France.
- Plana, S., Le Pennec, M., 1991. Alterations in the digestive diverticula and nutritional consequences in the clam *Ruditapes philippinarum* infected by a *Vibrio*. *Aquat. Living Resour.* 4, 255–264. doi:10.1051/alr:1991027
- Plana, S., Siquin, G., Maes, P., Paillard, C., LePennec, M., 1996. Variations in biochemical composition of juvenile *Ruditapes philippinarum* infected by a *Vibrio sp.* *Dis. Aquat. Organ.* 24, 205–213. doi:10.3354/dao024205
- Ponurovsky, S.K., Yakovlev, Y., 1992. The reproductive biology of the Japanese littleneck, *Tapes philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850)(Bivalvia: Veneridae). *J. Shellfish Res.* 11, 265–265.
- Power, A., Sheehan, D., 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 114, 99–103. doi:10.1016/0742-8413(96)00024-2
- Powis, G., Montfort, W.R., 2001. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 421–455. doi:10.1146/annurev.biophys.30.1.421
- Pushpamali, W.A., De Zoysa, M., Kang, H.-S., Oh, C.H., Whang, I., Kim, S.J., Lee, J., 2008. Comparative study of two thioredoxin peroxidases from disk abalone (*Haliotis discus discus*): cloning, recombinant protein purification, characterization of antioxidant activities and expression analysis. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 294–307.
- Raftos, D.A., Kuchel, R., Aladaileh, S., Butt, D., 2014. Infectious microbial diseases and host defense responses in Sydney rock oysters. *Front. Microbiol.* 5, 135. doi:10.3389/fmicb.2014.00135
- Raftos, D., Cooper, E., Habicht, G., Beck, G., 1991. Invertebrate Cytokines - Tunicate Cell-Proliferation Stimulated by an Interleukin-1-Like Molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9518–9522. doi:10.1073/pnas.88.21.9518
- 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. Organ.* 56, 249–258. doi:10.3354/dao056249
- Revathy, K.S., Umasuthan, N., Lee, Y., Choi, C.Y., Whang, I., Lee, J., 2012a. First molluscan theta-class Glutathione S-Transferase: Identification, cloning, characterization and transcriptional analysis post immune challenges. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 162, 10–23. doi:10.1016/j.cbpb.2012.02.004
- Revathy, K.S., Umasuthan, N., Lee, Y., Whang, I., Kim, H.C., Lee, J., 2012b. Cytosolic thioredoxin from *Ruditapes philippinarum*: Molecular cloning, characterization, expression and DNA protection activity of the recombinant protein. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 85–92. doi:10.1016/j.dci.2011.06.006
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Jeong, W., Chang, T.-S., Yang, K.-S., Woo, H.A., 2005. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 183–189.
- Richard, G., 2012. Impact de l'exposition à *Alexandrium ostenfeldii* couplé à l'infection parasitaire par *Perkinsus olseni* sur les enzymes du système antioxydant de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* (Rapport de M2).
- Richard, G., Le Bris, C., Guerard, F., Lambert, C., Paillard, C., 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum*

- challenged with *Vibrio tapetis* - Part II: Combined effect of temperature and two *V-tapetis* strains. *Fish Shellfish Immunol.* 44, 79–87. doi:10.1016/j.fsi.2014.12.039
- Richard, G., Miner, P., Bidault, A., Pernet, F., Corporeau, C., Boudry, P., Guérard, F., Paillard, C., Lambert, C., submitted. Brown Ring Disease in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: effect of algal diet quality and reproduction status.
- Riley, P.A., 1997. Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1235–1239.
- Robert, R., Parra, R., 1991. Experimental study of predation by the gilthead bream, *Sparus aurata* and the gray triggerfish, *Balistes capriscus* on the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Aquat. Living Resour.* 4, 181–189. doi:10.1051/alr:1991020
- Rodrigues, S., Paillard, C., Dufour, A., Bazire, A., 2015. Antibiofilm Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp 3J6 Against *Vibrio tapetis*, the Causative Agent of Brown Ring Disease. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 7, 45–51. doi:10.1007/s12602-014-9173-3
- Rowley, A.F., Powell, A., 2007. Invertebrate immune systems—specific, quasi-specific, or nonspecific? *J. Immunol.* 179, 7209–7214.
- Sanchez, F., Caill-Milly, N., Lissardy, M., Bru, N., 2014. Campagne d'évaluation de stock de palourdes du bassin d'Arcachon. Année 2014.
- Sauvage, C., Pepin, J.F., Lapegue, S., Boudry, P., Renault, T., 2009. Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: Differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Res.* 142, 181–187. doi:10.1016/j.virusres.2009.02.013
- Selye, H., 1952. THE STORY OF THE ADAPTATION SYNDROME. *Am. J. Med. Sci.* 224, 711.
- Selye, H., 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *Br. Med. J.* 1, 1383.
- Selye, H., 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation 1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 6, 117–230.
- Shaw, B.L., Battle, H.I., 1957. The Gross and Microscopic Anatomy of the Digestive Tract of the Oyster *Crassostrea Virginica* (gmelin). *Can. J. Zool.* 35, 325–347. doi:10.1139/z57-026
- Sheehan, D., McDonagh, B., 2008. Oxidative stress and bivalves: a proteomic approach. *Invertebr. Surviv. J.* 5, 110–123.
- Sheehan, D., MEADE, G., Foley, V., Dowd, C., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360, 1–16.
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291–295.
- Sies, H., 1993. Strategies of Antioxidant Defense. *Eur. J. Biochem.* 215, 213–219. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x
- Sies, H., Sharov, V.S., Klotz, L.-O., Briviba, K., 1997. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J. Biol. Chem.* 272, 27812–27817.
- Smith, A.D., Levander, O.A., 2002. High-throughput 96-well microplate assays for determining specific activities of glutathione peroxidase and thioredoxin reductase. *Protein Sens. React. Oxyg. Species Pt Selenoproteins Thioredoxin* 347, 113–121.
- Snieszko, S.F., 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes*. *J. Fish Biol.* 6, 197–208.
- Soderhall, K., Aspan, A., Duvic, B., 1990. The Propo-System and Associated Proteins - Role in Cellular Communication in Arthropods. *Res. Immunol.* 141, 896–907. doi:10.1016/0923-2494(90)90190-A

- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 23–28.
- Solidoro, C., Pastres, R., Melaku Canu, D., Pellizzato, M., Rossi, R., 2000. Modelling the growth of *Tapes philippinarum* in Northern Adriatic lagoons. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 199.
- Soudant, P., Chu, F.-L.E., Volety, A., 2013. Host-parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. *J. Invertebr. Pathol.* 114, 196–216. doi:10.1016/j.jip.2013.06.001
- Soudant, P., Marty, Y., Moal, J., Robert, R., Quere, C., LeCoz, J.R., Samain, J.F., 1996a. Effect of food fatty acid and sterol quality on *Pecten maximus* gonad composition and reproduction process. *Aquaculture* 143, 361–378. doi:10.1016/0044-8486(96)01276-8
- Soudant, P., Moal, J., Marty, Y., Samain, J.F., 1996b. Impact of the quality of dietary fatty acids on metabolism and the composition of polar lipid classes in female gonads of *Pecten maximus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 205, 149–163. doi:10.1016/S0022-0981(96)02608-1
- 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. doi:10.1016/S0044-8486(03)00352-1
- Soudant, P., Van Ryckeghem, K., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.F., Sorgeloos, P., 1999. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between a reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 123, 209–222. doi:10.1016/S0305-0491(99)00063-2
- Sparling, P.F., 1983. Bacterial virulence and pathogenesis: an overview. *Rev. Infect. Dis.* 5, S637–S646.
- Stefano, G.B., Cadet, P., Dokun, A., Scharrer, B., 1990. A neuroimmunoregulatory-like mechanism responding to stress in the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Brain. Behav. Immun.* 4, 323–329.
- Stefano, G.B., Salzet-Raveillon, B., Salzet, M., 1999. *Mytilus edulis* hemolymph contains pro-opiomelanocortin: LPS and morphine stimulate differential processing. *Mol. Brain Res.* 63, 340–350.
- Sukhotin, A.A., Abele, D., Pörtner, H.-O., 2002. Growth, metabolism and lipid peroxidation in *Mytilus edulis* L.: age and size effects. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 226, 223–234.
- Sukhotin, A.A., Pörtner, H.-O., 2001. Age-dependence of metabolism in mussels *Mytilus edulis* (L.) from the White Sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 257, 53–72.
- Sussarellu, R., Fabioux, C., Le Moullac, G., Fleury, E., Moraga, D., 2010. Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. *Mar. Genomics* 3, 133–143.
- Tafalla, C., Novoa, B., Figueras, A., 2002. 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.* 132, 423–431.
- Tamayo, D., Corporeau, C., Petton, B., Quere, C., Pernet, F., 2014. Physiological changes in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to the herpesvirus OsHV-1 μ Var. *Aquaculture* 432, 304–310.

- Tanguy, A., Guo, X.M., 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. doi:10.1016/j.gene.2004.05.019
- Tarhan, L., Tuzmen, M.N., 2000. Some properties of Cu, Zn-superoxide dismutase from sheep erythrocyte. *Turk. J. Chem.* 24, 109–116.
- Tompkins, J., Culture Collection of Algae and Protozoa, Natural Environment Research Council (Great Britain), 1995. Catalogue of strains, 1995. Culture Collection of Algae and Protozoa, Ambleside, Cumbria, U.K.
- Torreilles, J., Guerin, M.C., 1999. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes in vitro. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 509–518. doi:10.1006/fsim.1998.0200
- Travers, M.-A., Basuyaux, O., Le Goic, N., Huchette, S., Nicolas, J.-L., Koken, M., Paillard, C., 2009. Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Glob. Change Biol.* 15, 1365–1376. doi:10.1111/j.1365-2486.2008.01764.x
- 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 Shellfish Immunol.* 25, 800–808. doi:10.1016/j.fsi.2008.08.003
- 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. Université de Bretagne occidentale-Brest.
- 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. *J. Invertebr. Pathol.* 104, 8–16. doi:10.1016/j.jip.2009.12.007
- Trueman, E.R., Brand, A.R., Davis, P., 1966. The dynamics of burrowing of some common littoral bivalves. *J. Exp. Biol.* 44, 469–492.
- Umasuthan, N., Bathige, S.D.N.K., Revathy, K.S., Lee, Y., Whang, I., Choi, C.Y., Park, H.-C., Lee, J., 2012a. A manganese superoxide dismutase (MnSOD) from *Ruditapes philippinarum*: Comparative structural- and expressional-analysis with copper/zinc superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) and biochemical analysis of its antioxidant activities. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 753–765. doi:10.1016/j.fsi.2012.06.024
- Umasuthan, N., Revathy, K.S., Lee, Y., Whang, I., Choi, C.Y., Lee, J., 2012b. A novel molluscan sigma-like glutathione S-transferase from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: Cloning, characterization and transcriptional profiling. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 155, 539–550. doi:10.1016/j.cbpc.2012.01.001
- Umasuthan, N., Revathy, K.S., Lee, Y., Whang, I., Lee, J., 2012c. Mitochondrial thioredoxin-2 from Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) is a potent antioxidant enzyme involved in antibacterial response. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 513–523. doi:10.1016/j.fsi.2011.12.010
- Uzaki, N., Kai, M., Aoyama, H., Suzuki, T., 2003. Changes in mortality rate and glycogen content of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during the development of oxygen-deficient waters. *Fish. Sci.* 69, 936–943.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- Venables, W.N., Ripley, B.D., 2013. *Modern applied statistics with S-PLUS*. Springer Science & Business Media.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D., Orunesu, M., 1991. Age-Related Lipid-Peroxidation in the Digestive Gland of Mussels - the Role of the Antioxidant Defense Systems. *Experientia* 47, 454–457. doi:10.1007/BF01959942
- Villamil, L., Gomez-Leon, J., Gomez-Chiarri, M., 2007. Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 968–977. doi:10.1016/j.dci.2007.01.006
- Walne, P.R., 1976. Experiments on the culture in the sea of the butterfish *Venerupis decussata* L. *Aquaculture* 8, 371–381. doi:10.1016/0044-8486(76)90119-8
- Wang, C., Huan, P., Yue, X., Yan, M., Liu, B., 2011. Molecular characterization of a glutathione peroxidase gene and its expression in the selected *Vibrio*-resistant population of the clam *Meretrix meretrix*. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 1294–1302. doi:10.1016/j.fsi.2011.03.015
- Wang, C., Yue, X., Lu, X., Liu, B., 2013. The role of catalase in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 91–99. doi:10.1016/j.fsi.2012.10.013
- Wang, X., Wang, L., Zhang, H., Liu, R., Song, L., 2015. The carbohydrate metabolism of scallop *Chlamys farreri* in the immune response against acute challenge of *Vibrio anguillarum*. *Aquac. Int.* 23, 1141–1155. doi:10.1007/s10499-014-9871-6
- Wendling, C.C., Wegner, K.M., 2013. Relative contribution of reproductive investment, thermal stress and *Vibrio* infection to summer mortality phenomena in Pacific oysters. *Aquaculture* 412, 88–96. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.07.009
- Wickham, H., Chang, W., 2015. *ggplot2: An Implementation of the Grammar of Graphics*.
- Winston, G., Digiulio, R., 1991. Prooxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic Organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161. doi:10.1016/0166-445X(91)90033-6
- Wootton, E.C., Dyrinda, E.A., Ratcliffe, N.A., 2006. Interaction between non-specific electrostatic forces and humoral factors in haemocyte attachment and encapsulation in the edible cockle, *Cerastoderma edule*. *J. Exp. Biol.* 209, 1326–1335.
- Wootton, E.C., Pipe, R.K., 2003. Structural and functional characterisation of the blood cells of the bivalve mollusc, *Scrobicularia plana*. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 249–262.
- Wright, W.G., 1988. Sex change in the Mollusca. *Trends Ecol. Evol.* 3, 137–140.
- Xue, Q.-G., Itoh, N., Schey, K.L., Li, Y.-L., Cooper, R.K., La Peyre, J.F., 2007. A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 82–95.
- Xue, Q.-G., Schey, K.L., Volety, A.K., Chu, F.-L.E., La Peyre, J.F., 2004. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 139, 11–25.
- Xue, Q.-G., Waldrop, G.L., Schey, K.L., Itoh, N., Ogawa, M., Cooper, R.K., Losso, J.N., La Peyre, J.F., 2006. A novel slow-tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (*Crassostrea virginica*) plasma inhibits perkinsin, the major extracellular protease of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 145, 16–26.

- Xue, Q., Itoh, N., Schey, K.L., Cooper, R.K., La Peyre, J.F., 2009. Evidence indicating the existence of a novel family of serine protease inhibitors that may be involved in marine invertebrate immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 250–259.
- Zapata-Vivenes, E., Nusetti, O., 2007. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis*. *J. Shellfish Res.* 26, 335–344.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., others, 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54.
- Zhang, Y., Li, J., Yu, F., He, X., Yu, Z., 2013. Allograft inflammatory factor-1 stimulates hemocyte immune activation by enhancing phagocytosis and expression of inflammatory cytokines in *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1071–1077. doi:10.1016/j.fsi.2013.01.014
- 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, e13480. doi:10.1371/journal.pone.0013480
- Zhou, Z., Wang, L., Shi, X., Zhang, H., Gao, Y., Wang, M., Kong, P., Qiu, L., Song, L., 2011. The modulation of catecholamines to the immune response against bacteria *Vibrio anguillarum* challenge in scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 1065–1071. doi:10.1016/j.fsi.2011.09.009

Annexe 1

Development of a Taqman real-time PCR assay for rapid detection and quantification of
Vibrio tapetis in extrapallial fluids of clams

Adeline Bidault¹, Gaëlle Richard¹, Cédric Le Bris¹, Christine Paillard¹

¹ Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539 UBO/CNRS/IRD/Ifremer, Université de Brest,
Technopôle Brest-Iroise, rue Dumont D'Urville, 29280 Plouzané, France

Corresponding author:

Adeline Bidault

Technopôle Brest-Iroise, rue Dumont D'Urville, 29280 Plouzané, France

E-mail address: adeline.bidault@univ-brest.fr

Abstract

The Gram-negative bacterium *Vibrio tapetis* is known as the causative agent of Brown Ring Disease (BRD) in the Manila clam *Venerupis (= Ruditapes) philippinarum*. This bivalve is the second most important species produced in aquaculture and has a high commercial value. In spite of the development of several molecular methods, no survey has been yet achieved to rapidly quantify the bacterium in the clam. In this study, we developed a Taqman real-time PCR assay targeting *virB4* gene for accurate and quantitative identification of *V. tapetis* strains pathogenic to clams. Sensitivity and reproducibility of the method were assessed using either filtered sea water or extrapallial fluids of clam injected with the CECT4600^T *V. tapetis* strain. Quantification curves of *V. tapetis* strain seeded in filtered seawater (FSW) or extrapallial fluids (EF) samples were equivalent showing reliable qPCR efficacies. With this protocol, we were able to specifically detect *V. tapetis* strains down to $1.125 \cdot 10^1$ bacteria per mL of EF or FSW, taking into account the dilution factor used for appropriate template DNA preparation. This qPCR assay allowed us to monitor *V. tapetis* load both experimentally or naturally infected Manila clams. This technique will be particularly useful for monitoring the kinetics of massive infections by *V. tapetis* and for designing appropriate control measures for aquaculture purposes.

Introduction

The Manila clam *Venerupis philippinarum* (Adam & Reeve 1850) is the second most important aquaculture species in the world, after the oyster *Crassostrea gigas* (Gosling, 2008). *V. philippinarum* was introduced to French coasts in 1972 from the Pacific Coast of North America for economic purposes. The species progressively colonized the European coasts as it grows faster than the endemic European clam *Venerupis decussatus* (Flassch & Leborgne, 1994). In 1987, mass mortalities of cultured clams occurred in the main French

production site located at Landéda (Brittany, France). Mortalities have been attributed to the Brown Ring Disease (BRD) due to the pathogenic Gram-negative bacterium *Vibrio tapetis* (Paillard & Maes, 1990).

V. tapetis first colonizes the periostracal lamina of the clam between the mantle and the shell. The proliferation of the pathogen in the periostracal lamina and extrapallial fluids (EF) inhibits the normal shell biomineralization process, resulting in a brown deposit of melanised matrix (conchiolin) on the inner surface of the valves (Paillard & Maes, 1994) (Paillard & Maes, 1995a). The clam's extrapallial fluids have been demonstrated to be a major compartment in the early stage of the defense process against the infection (Allam, Paillard & Maes, 1996) (Allam, 1998). Indeed, extrapallial fluids contain numerous hemocytes (Allam, Paillard & Auffret, 2000) which are responsible for phagocytosis of micro-organisms (Allam & Paillard, 1998). Accumulation of hemocytes suggests an efficient defense system able to neutralize the pathogen before colonization of the extrapallial cavity and eventually tissues and could lead to septicemia (Allam & Ford, 2006). In this case, the penetration of *V. tapetis* into the hemolymph can provoke mortality before the clam exhibits BRD symptoms (Allam, Paillard & Ford, 2002) (Paillard, Allam & Oubella, 2004). In natural environment, the prevalence range of BRD in Manila clam has been estimated as 10 to 20% (Paillard et al., 2014).

Here, pathogenicity and virulence are defined as proposed in Casadevall and Pirofski (Casadevall & Pirofski, 1999) and Sparling (Sparling, 1983), that is to say as the capacity of a microbe to cause damage to the , and the degree of pathogenicity respectively. A subtractive bank between two *V. tapetis* strains, i.e. the fish pathogen LP2 and the clam pathogen CECT4600^T revealed that some genes are present only in the genome of the *V. tapetis* strain pathogenic to *V. philippinarum* (unpublished data). Among these genes, *virB4* existed only in the genome of the clam pathogen CECT4600^T (accession number: KT382306). This finding suggests that some of these genes may be specifically associated with pathogenicity in the Manila clam. The genomes of several *V. tapetis* strains, including CECT4600^T, were recently sequenced (Dias et al. *in prep*), confirming the presence of one copy of the *virB4* gene in the CECT4600^T chromosome, using the MicroScope genomics platform (Vallenet et al., 2013). The *virB4* gene encodes a protein involved in a large complex assigned to type IV secretion systems (T4SSs). In bacteria, secretion is essential for virulence and survival. Bacteria use

T4SSs to translocate DNA and protein substrates across the cell envelope (Juhas, Crook & Hood, 2008) (Low et al., 2014) (Christie, Whitaker & González-Rivera, 2014), which contributes to genome plasticity and the evolution of pathogens through dissemination of antibiotic resistance and virulence genes (Fronzes, Christie & Waksman, 2009).

Classical methods currently used to identify *Vibrio* species associated with BRD were based on the cultivability of bacteria on non-selective synthetic medium and biochemical criteria (Borrego et al., 1996). Phylogenetic and molecular identification of *Vibrionaceae*, at the family and genus levels, can also be obtained by Multi Locus Sequence Typing using the *rpoA*, *recA* and *pyrH* genes (Thompson et al., 2005) or the *gyrB* gene (Le Roux et al., 2004) (Yamamoto et al., 2000). Likewise, Single Specific Primer-PCR (SSP-PCR) amplification related to 16S rRNA identity (Paillard et al., 2006) or molecular typing and fingerprinting methods (Romalde et al., 2002) (Rodríguez et al., 2006) have been developed. Drummond and collaborators (Drummond et al., 2006) showed that the combination of shell valve analysis with the SSP-PCR assay of Paillard *et al.* (Paillard et al., 2006) proved to be most sensitive but was time-consuming and not specific enough and sensitive enough to detect *V. tapetis* pathogens in clams. These methods are therefore inadequate for monitoring individual clams and above all, inappropriate to detect asymptomatic infected clams.

The aim of this study was to develop a rapid and accurate detection method for *Vibrio tapetis*, the causative agent of BRD, which is of growing interest due to the increased prevalence of the disease and the high commercial value of clams. Taqman real-time PCR protocols have previously been carried out for *V. aestuarianus* (Saulnier, De Decker & Haffner, 2009) (McCleary & Henshilwood, 2015) and *V. harveyi* (Schikorski et al., 2013). In this paper, we developed a Taqman real-time PCR assay for specific and rapid *V. tapetis* detection and quantification from extrapallial fluids of clams, and validated it on both pure cultures and through an experimental infection of *V. philippinarum* by a virulent *V. tapetis* strain.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

Bacteria belonging to twelve *Vibrio* species and seventeen strains of *V. tapetis* isolated from clams and fishes were used in this study (Table 1) as positive and negative controls to check species specificity of the designed primers. Some reference strains were purchased from CIP and LMG collections. *V. anguillarum* strain 775 was supplied by J.H. Crosa (Frans et al., 2011) (Crosa, Schiewe & Falkow, 1977). The Norwegian S2-2 strain was kindly offered by S. Mortensen from the Institute of Marine Research at Bergen in Norway. Finally, the FPC 1121 strain was graciously provided by T. Matsuyama (Matsuyama et al., 2010). The other strains were available from the LEMAR collection.

The *V. tapetis* CECT4600^T strain was used for the experimental infection as the reference strain (Paillard & Maes, 1995b) (Borrego et al., 1996).

All bacterial strains were cultured in Zobell medium (paste 4 g/L, yeast extract 1 g/L, sea salt 30 g/L at pH 7.4) enriched with iron phosphate (0.1 g/L) at 18°C during 18 h under constant shaking at 180 rpm (Infors HT®) (Balboa et al., 2012).

Clams, experimental infection and extrapallial fluids collection (EF)

Two year old *Venerupis philippinarum* were provided by Fabien Fonteneau in Marennes-Oleron (“Les Claires de Bonsonge”®, EARL, brood stock producer). A first health diagnostic was performed *in situ* on 50 clams to ensure absence of BRD, prior to the sampling effort for the bacterial challenge. They were transferred to the Ifremer’s facilities (Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, LEMAR, Plouzané) for six days quarantine with chloramphenicol (8 mg/L, Sigma®) at 13°C.

For the duration of the experiment, clams were split randomly into eighteen 100 L-tanks with air-lift systems and a complete water-renewal every two days. During the whole experiment, clams were daily fed an algal ration (maintenance ratio from FAO, 2004) of two algae commonly used in aquaculture (*Isochrysis affinis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*) (Figure 1 and Figure A - supplementary file).

Four weeks after algal-conditioning, clams were exposed to air for 12 hours in the experimental room and replaced into water just before injection to facilitate valve opening. Seventy two clams were injected, in the extrapallial cavity, with 100 µL of Filtered Sea Water

(FSW), 72 were injected with 100 μ L of *V. tapetis* CECT4600^T fresh suspension, at a 10^7 cells per mL density and the last 72 clams were not injected (Figure 1).

Twelve samples from each three different conditions (a total of 36 clams) were sampled at six different time points (216 clams sampled in total): 0d, 1d, 2d, 7d, 14d and 30d (respectively 0 - not injected, 1, 2, 7, 14 and 30 days post injection). For each clam, 500 μ L of extrapallial fluids were collected close to the shell under mantle, using a syringe fitted with a 25-G needle. The fluids were immediately flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until DNA extraction.

Extrapallial fluids from an additional 40 clams were withdrawn and pooled to constitute the bacteria dilution range. Fifteen mL of the resulting pool were filtered from 80 μ m to 0.22 μ m, with intermediary filtrations at 10 μ m, 1 μ m and 0.45 μ m, to obtain extrapallial fluids free of bacteria.

The presence of *V. tapetis* CECT4600^T was determined and quantified in collected samples by real-time PCR using the appropriate standard curve.

BRD diagnostic method

After fluid collection, clams' shells were retrieved at each sampling in order to diagnose BRD occurrence. Images of inner shells were obtained using a 50 mm Canon[®] macroscopic lens and analyzed using image analysis software (Visilog[®] 6.6) (Richard et al. *in prep*). Subsequently, clams exhibiting brown ring deposit surfaces were defined as BRD positive (BRD+) in this study (Figure 2). Those that were visibly healthy were reported as BRD negative (BRD-).

Total DNA extraction from bacterial culture and from EF

DNA extraction was performed using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen[®]) for both bacterial cultures and total extrapallial fluids. 450 μ L were centrifuged at 10,000 g at 4°C for 10 minutes. Pellets were deproteinized in a hot dry bath at 56°C by addition of 180 μ L of ATL Buffer supplemented by 20 μ L of proteinase K during one hour. DNA extractions were then performed according to supplier instructions. Finally, DNA were eluted in 200 μ L of ultra-pure water and stored at -20°C until use. DNA yield and purity were determined by

spectrophotometry (Quantifluor® dsDNA kit, Promega® and POLARstar Omega microplate spectrophotometer, BMG Labtech®).

Enumeration of *V. tapetis* by spectrophotometry

In order to accurately inoculate CECT4600^T at the target dilution of 10⁷ cells/mL during the experiment, enumeration of bacteria was performed to measure the absorbance at 492 nm on a Multiskan® spectrophotometer (Fisher Scientific®). *Vibrio tapetis* culture density was calculated according to the formula $1.3 \cdot 10^9 \times \text{DO} - 3.6 \cdot 10^7$ CFU/mL (Choquet, 2004) (Le Bris et al., 2015).

For the dilution ranges of bacteria (described below), an early stationary phase culture of CECT4600^T was enumerated, and was first diluted in Filtered SeaWater (FSW) to obtain a 10⁸ cells/mL suspension. Bacteria were then serially diluted in FSW in a final volume of 500 µL from 2.25 10⁷ to 0.565 10¹ cells/mL (ten-fold dilutions until 2.25 10¹ and half dilutions for the last two) to generate the standard curve of bacteria. DNA was extracted from 450 µL of each diluted suspension. For the second standard curve in extrapallial fluids, FSW was replaced by filtered EF prepared previously. DNA extractions were also performed on 450 µL of sterile EF in the same conditions in order to establish a negative control for the standard curve.

PCR primer and fluorogenic probe design

Oligonucleotide sequences used in this study are listed in Table 2. The *virB4* primers and probe were developed to target exclusively the *virB4* gene existing in the pathogenic *Vibrio tapetis* CECT4600^T (Genbank accession number: KT382306). Using Primer-3 software, several primers pairs were designed and tested with DNA samples of different species and strains of the *Vibrio* genus available as positive and negative controls on a 9700 ABI® thermocycler (Applied Biosystems®) (Table 1). The choice for the best primer pair was determined, with optimal concentration and reaction conditions for PCR amplification compatible with the hydrolysis Taqman probe (Table 2). The *virB4* probe was dually labeled with 5'-reporter dye 6-FAM (wavelength emission at 502nm) and a downstream 3'-quencher dye TAMRA.

The selectivity of the primers was checked using the BLAST algorithm of the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), assuring their specificity for the *virB4* region, without homology to other known sequences described in GenBank and EMBL databases.

Oligonucleotides were also aligned to the CECT4600^T and LP2 genomes to ensure that they selectively amplified only the *virB4* gene. Primers and probe were purchased from Eurogentec[®] (Angers, France). The expected length of the amplicon deduced from nucleotide sequence was 173 bp, and the selectivity was also theoretically assessed by BLAST.

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Real-time PCR was performed on a LightCycler 480[®] Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using LightCycler 480[®] Probe Master Mix based on Taqman detection (Roche[®] Diagnostics). Each real-time PCR experiment included technical triplicates, in a final volume of 15 µL. Each reaction contained 5 µL of DNA template, 0.5 µM of each primer, 0.1 µM of hydrolysis probe virB4-P1 and 7.5 µL of LC480 Probe Master Mix 2X. A single initial denaturation step of 10 min at 95°C was followed by 45 cycles of 95°C for 10 sec (denaturation), 54°C for 20 sec (annealing) and 72°C for 1 sec to measure the fluorescence signal. Finally, a cooling step at 40°C during 10 sec was included. The results were analyzed with Roche LightCycler[®] 480 software. Threshold cycle (Ct) value corresponds to the PCR cycle number at which an increase in reporter fluorescence above a baseline signal was first detected, after background subtraction. Negative controls with molecular biology grade water as template were performed in each run. For quantitation, dilution ranges of *V. tapetis* were tested in triplicates across multiple orders of magnitude described above. Results were analyzed by linear regression to calculate the slope. The PCR amplification efficiency (E) was measured according to $E = [10^{1/(-\text{slope})}] - 1$, using the Roche LightCycler[®] 480 software. Standard curve data points were used to determine real-time PCR quantification and detection limits through the assessment of the variance (standard deviation), measured at each dilution standard. In conformity with ISO 16140, the limit of detection (LOD) was calculated in accordance with 95% of 20 tested replicates giving positive amplification results (Bustin et al., 2009). The repeatability (intra-assay variance) was estimated using triplicates of each template to assess the precision of the method. The reproducibility (inter-assay variance) was calculated using standard deviation (SD) of two *virB4* gene standard concentrations used for each run to assess the variation between runs.

Results

Selectivity of the real-time PCR protocol

Sequence alignments of the real-time Taqman PCR amplicon showed no cross reactivity with others species when compared using the BLAST analysis program. Only one theoretical partial cross reactivity with *V. tasmaniensis* (KP795691.1, 78% of identity with differences in 3' end terminals of both forward primer and Taqman hydrolysis probe) appeared with BLAST analysis when comparisons were extended (more dissimilar sequence search settings). The species selectivity of the real-time PCR assay developed for the identification of *V. tapetis* was empirically evaluated in this study on 17 *V. tapetis* strains (Table 1), including two reference strains CECT4600^T and LP2, isolated from the Manila clam *Venerupis philippinarum* and the fish *Symphodus melops*, respectively, and 12 marine pathogens, mostly *Vibrio*, except for one (*Halomonas sp.*). Real-time PCR results obtained showed that all virulent *V. tapetis* strains tested, i.e. able to reproduce BRD after injection into the pallial cavity (Choquet et al., 2003) (Paillard, Allam & Oubella, 2004), were positive (except for FPC1121 strain, a Japanese *V. tapetis*), whatever the geographical origin of the bacterial strain. For example, UK6 and IS9 strains were clearly positives though they were isolated from *V. philippinarum* in United Kingdom and from *C. edule* in France, respectively. Moreover, the LP2 reference strain which is a pathogen for *S. melops* (Jensen et al., 2003) but not for the Manila clam (Paillard, Allam & Oubella, 2004), did not show any signal for the *virB4* gene (Figure 3). No amplification was detected with bacterial strains belonging to the other *Vibrio* species ($n=12$), even for the closest phylogenetic neighbors to *V. tapetis*, among tested strains (*V. tasmaniensis*, *V. splendidus*, *V. lentus*) (Thompson, Thompson & Swings, 2002) (Le Roux et al., 2004; Sawabe et al., 2013; Al-saari et al., 2015), in agreement with the empirical and theoretical results generated by BLAST.

Positive signals obtained by real-time PCR experiments for bacterial strains were checked by electrophoresis. The amplicon observed at 173 bp, corresponds to the expected size, calculated from the nucleotide sequence of the *virB4* gene (Figure 3).

Sensitivity of the real-time PCR assay

Standard curves for *virB4* gene quantification were generated in parallel in filtered sterile water (FSW) and total extrapallial fluids (EF) with pure bacterial suspension of *V. tapetis* CECT4600^T strain of known concentrations, determined by spectrophotometry and checked

by the Malassez counting method. Ten-fold bacterial dilutions ranging from $2.25 \cdot 10^7$ to $2.25 \cdot 10^2$ cells.mL⁻¹, and two last half dilutions to $0.565 \cdot 10^1$ cells.mL⁻¹ were prepared in these two diluents. Since only one copy of the chromosomal *virB4* gene is present per bacteria, the threshold cycle (Ct) values deduced from real-time PCR amplifications on purified DNA extracts were plotted to the number of bacteria initially present in PCR templates.

Because similar slopes were achieved for quantification curves of each diluent in this study (data not shown), the standard curve in EF was chosen for analyzing the experimental infection samples as this diluent corresponded to the *in situ* conditions of the samples, namely *V. tapetis* in EF.

The standard curve reliably showed linearity across 8 orders of magnitude, from $2.25 \cdot 10^7$ to $1.125 \cdot 10^1$ cells.mL⁻¹. The final dilution ($0.565 \cdot 10^1$ cells.mL⁻¹) produced less consistent results, and was not retained for the calculation of the standard curve. After extractions, genomic DNA was checked by spectrophotometry and corresponded to values ranging from 900 pg.μL⁻¹ to 156 pg.μL⁻¹. According to the Ct values obtained in triplicates, quantification curve exhibited an excellent linear regression with an r^2 correlation coefficient of 0.99 and a PCR efficacy of 103% (Figure 4) calculated in the linear zone according to the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009). The intra-assay variance was evaluated from 0.01 and 0.32 from all the samples tested in triplicate. The reproducibility, calculated using the standard deviation of Ct values generated from two standard concentrations of $2.25 \cdot 10^2$ cells.mL⁻¹ and $2.25 \cdot 10^6$ cells.mL⁻¹ from different runs, corresponded to 0.14 and 0.10 respectively.

The threshold sensitivity of this method in targeting the presence of *virB4* gene and quantification is given by the lower bacterial concentration detected in the linear zone (at least 95% of 20 tested replicates), and corresponds to the limit of detection (LOD) of *V. tapetis* of $1.125 \cdot 10^1$ bacteria.mL⁻¹.

Specificity of the method: kinetics of infection during Manila clams challenge

The quantification of CECT4600^T DNA in extrapallial fluids sampled from infected clams was estimated by reporting Ct values to the standard quantification curve of the *virB4* gene previously established for EF. The limit of detection established previously corresponded to a cell density of $1.125 \cdot 10^1$ bacteria per mL of extrapallial fluids.

Overall during the experiment, each sampling time of CECT4600^T injected clams exhibited at least two positive individuals by the real-time PCR assay (Figure 5). Only 24 hours after injection, nine individuals among twelve were spotted with the *virB4* detection protocol. At

the same time, all of them were BRD-. It was noticeable that at 7 days post-injection only two real-time PCR positive animals were detected, but with a high *V. tapetis* load, at nearly 10^7 cells per mL in EF (6.53×10^6 cells.mL⁻¹). As regards the BRD among CECT4600^T-injected clams identified as positive by real-time PCR, one individual at 2 days and one at 7 days were classified as BRD+. At 14 and 30 days post-injection, four clams at each time were positive according to the qPCR assay and they were all BRD+. All these *V. tapetis*-positive individuals showed a bacterial load above 10^2 cells per mL in extrapallial fluids, with a maximum of 1.11×10^4 cells per mL in extrapallial fluids.

The *virB4* gene was also detected in several non-injected individuals: two animals on the day of infection; and one each at 2, 7 and 30 days during the experiment (Figure 6 and the points 0d on Figure 5 & 7). The animals were BRD- at 0 and 30 days of the experiment whereas the two positive *virB4* clams (2d and 7d on Figure 6) displayed clinical signs of BRD.

Regarding the detection of *virB4* gene by real-time PCR assay on animals injected with FSW (Figure 7), one individual tested positive on the day of the infection. Six animals were identified as positive 24 hours after the injection of FSW. Two days post-injection, two clams among 12 were positive according to the Taqman protocol and at later times, only one clam was tested positive at 7, 14 and 30 days post-injection.

Discussion

In this study, we developed a rapid and accurate real-time PCR process for the detection and quantification of *V. tapetis* pathogens for clams in extrapallial fluids of the Manila clam. This protocol was designed using a pair of primers and a Taqman probe targeting the *virB4* gene of *V. tapetis*, encoding a protein engaged in a large complex of type IV secretion systems.

Several publications dealing with rapid and specific molecular identification of *Vibrio* species use PCR techniques. Various PCR assays have been published (Thompson et al., 2005) (Paillard et al., 2006) (Rodríguez et al., 2006) that have investigated *Vibrio tapetis*. These methods, based on 16S rRNA sequences are less reliable and can be time-consuming when associated with the BRD diagnostic necessary to achieve *Vibrio tapetis* identification (Drummond et al., 2006). Moreover, these protocols do not allow quantification of the bacteria.

According to our knowledge, most real-time PCR assays targeting detection and quantification of *Vibrio* species have been developed in *Vibrio* spp. impacting public health risk, e.g. *Vibrio cholerae* (Gubala, 2006) (Mehrabadi et al., 2012), *Vibrio vulnificus* (Garrido-Maestu et al., 2014). Only rarely have studies dealt with marine pathogenic *Vibrio*, e.g. *V. aestuarianus* and *V. harveyi* (Saulnier, De Decker & Haffner, 2009) (Schikorski et al., 2013). In this work, we have performed for the first time a real-time PCR protocol to detect *V. tapetis* bacteria.

The specificity of primers and Taqman probe have been demonstrated here with the real-time PCR assays carried out on DNA samples extracted from pure cultures of various bacterial strains belonging to the *V. tapetis* group. No signal was obtained with other species close related to *V. tapetis* (belonging to *V. splendidus* or *V. tasmaniensis*), even at high threshold cycle values (Ct > 45). Positive fluorescence signals were acquired with all *V. tapetis* strains virulent for *V. philippinarum*, except the FPC1121 Japanese strain (Table 1). We suggest that this strain lacks the *virB4* gene and we could speculate that this Japanese strain uses a different secretion system from the type IV to translocate substrate for its virulence (Dias et al. *in prep*).

The standard curves generated by real-time PCR in filtered sea water and extrapallial fluids demonstrated excellent coefficients of correlation for the primers and Taqman probe used. Furthermore, both standard curves were stackable indicating that the DNA extraction procedure for extrapallial fluids samples was satisfactory. Taking into account the dilution factor employed in this study to extract DNA from biological samples, we established the calculated threshold sensitivity of the method at 2.8×10^{-1} cells per well. Thus, the limit of detection of the *virB4* real-time PCR assay corresponds to 11.25 bacteria per mL of FSW or EF of clam. This limit of detection is very low compared to *V. harveyi* and *V. aestuarianus* detections methods, which are at 18 and 1.6 bacteria per well respectively (Schikorski et al., 2013) (Saulnier, De Decker & Haffner, 2009) and suggests our technique is useful for detecting both a weak and massive infections of *V. tapetis* in Manila clam.

We used the real-time PCR developed in this study to monitor the kinetics of *V. tapetis* experimental infection in clams. During bacterial challenge, early stages of the infection showed a high number of individuals infected and high bacteria load (until 7 days post-injection), confirming that extrapallial fluids are involved in the first steps of infection (Allam,

Paillard & Maes, 1996), where hemocytes contribute to defense against *V. tapetis* by phagocytosis (Allam & Paillard, 1998). At 7 days post-injection, only two individuals were detected as positive by the real-time PCR assay, suggesting that animals had efficiently defended against the pathogen. This hypothesis is corroborated by Richard and collaborators (Richard et al. *in prep*). This result also agrees with Paillard & Maes (Paillard & Maes, 1994), who showed that the first BRD symptoms appeared in almost all the clams seven days post-injection, bearing out the reaction of hosts facing a pathogen injection. Indeed, the conchiolin matrix was developed to trap encompassing bacteria into the inner surface of the shell, inducing a decrease of circulating bacteria in the EF, and thus a lower concentration detected by the Taqman assay. Then, 14 and 30 days after injection, CECT4600^T was again found in extrapallial fluids but the load was less than 7 days post-injection. Paillard and collaborators argue that an increase of *V. tapetis* in the host's fluids in advanced stages of the disease is due to the weakening of the clam (Paillard et al., 2014), despite food intake and shell repair.

Moreover, regarding individuals detected as positive among animals injected with FSW, we observed that they were mainly detected 1 day after injection. These results imply an effect of injection on animals which were supposedly infected by *V. tapetis*, present in their environment before sampling, despite the quarantine stage. It has already been shown that injection or handling could stimulate bacterial proliferation (Le Bris et al., 2015) (Jean et al., 2011). Focusing on non-injected clams, i.e. at 0d for *V. tapetis*- and FSW- injected clams and all the sampling times for non-injected clams, the interpretation that *V. tapetis* was present in individuals before sampling is corroborated: 2 individuals among 36 were already carrying bacteria the day of injection. During the remaining time, 3 non-injected animals were detected as positive by real-time PCR protocol, while 11 animals displayed clinical signs of BRD among 72 sampled (15%), suggesting that the host has already mounted a defense response against pathogens before the experimental challenge. This corresponds to the natural prevalence of the disease described in literature (Paillard et al., 2014).

To conclude, we developed in this study a rapid, specific and individual method to detect and quantify *V. tapetis*. This protocol is based on a real-time PCR assay and is suitable for field and hatchery animals. Indeed, this *virB4* real-time PCR assay is easy to implement because it does not require crushing and grinding and allows individual assays considering inter-individual variability. This protocol allows for early detection of the disease, especially to assess visibly healthy clams (BRD-), bearing in mind the threshold of detection, and will be very useful in helping prevent massive infection in clams, notably in clam aquaculture.

Acknowledgments

We would like to thank the company SATMAR for providing us with clams during the first steps of optimization of the method, and “Les Claires de Bonsonge” for supplying us clams for the experimental challenge. We are thankful to Valérie Barbe and Claudine Médigue from LABGeM and the National Infrastructure “France Genomique” for sequencing CECT4600^T strain and Annick Jacq for expert annotation. We thank Didier Mazel and Frédérique Leroux, in charge of the Vibroscope project within MaGe. We also thank Prof. Vianney Pichereau for his critical reading and advice on the manuscript, and Ewan Harney, a native speaker, for English corrections.

References

- Allam B. 1998. Rôle des fluides extrapalléaux des bivalves dans la défense immunitaire. Cas de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'élevage, *Ruditapes philippinarum*. Thèse de Doctorat de Biologie Thesis. Brest: Université de Bretagne occidentale-Brest.
- Allam B., Ford SE. 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 & Shellfish Immunology* 20:374–383.
- Allam B., Paillard C. 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Diseases of aquatic organisms* 33:123–128.
- 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 Invertebrate Pathology* 76:63–69.
- Allam B., Paillard C., Ford SE. 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Diseases of aquatic organisms* 48:221–231.
- Allam B., Paillard C., Maes P. 1996. Localization of the pathogen *Vibrio P 1* in clams affected by brown ring disease. *Diseases of aquatic organisms* 27:149–155.
- Al-saari N., Gao F., A.K.M. Rohul A., Sato K., Sato K., Mino S., Suda W., Oshima K., Hattori M., Ohkuma M., Meirelles PM., Thompson FL., Thompson C., A. Filho GM., Gomez-Gil B., Sawabe T., Sawabe T. 2015. Advanced Microbial Taxonomy Combined with Genome-Based-Approaches Reveals that *Vibrio astriarenae* sp. nov., an Agarolytic Marine Bacterium, Forms a New Clade in Vibrionaceae. *PLOS ONE* 10:e0136279.
- Balboa S., Dieguez AL., Doce A., Barja JL., Romalde JL. 2012. Evaluation of different culture media for the isolation and growth of the fastidious *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease. *Journal of Invertebrate Pathology* 111:74–81.
- Borrego JJ., Castro D., Luque A., Paillard C., Maes P., Garcia MT., Ventosa A. 1996. *Vibrio tapetis* sp. nov., the Causative Agent of the Brown Ring Disease Affecting Cultured Clams. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:480–484.
- Bustin SA., Benes V., Garson JA., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl MW., Shipley GL., Vandesompele J., Wittwer CT. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55:611–622.
- Casadevall A., Pirofski L. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and immunity* 67:3703–3713.
- Choquet G., Soudant P., Lambert C., Nicolas J-L., Paillard C. 2003. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Diseases of aquatic organisms* 57:109–116.
- Choquet G. 2004. Caractérisation et pathogénie des isolats de *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise. Doctorat Microbiologie Thesis. Brest: Université de Bretagne occidentale-Brest.
- Christie PJ., Whitaker N., González-Rivera C. 2014. Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843:1578–1591.
- Crosa JH., Schiewe MH., Falkow S. 1977. Evidence for plasmid contribution to the virulence of fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and immunity* 18:509–513.

- Dias G., Bidault A., Pichereau V., Choquet G., Orlando L., Sarkissian C., Le Chevalier P., Jacq A., Paillard C. Comparative phenotypic, molecular and virulence characteristics of *Vibrio tapetis* and related strains isolated from molluscs and fishes suffering vibriosis. *in prep. Plos pathogens*.
- Drummond LC., O'reilly P., Mulcahy MF., Culloty SC. 2006. Comparison of techniques for diagnosis of Brown Ring Disease and detection of *Vibrio tapetis* in the Manila clam, *Venerupis (Ruditapes) philippinarum*. *Journal of Shellfish Research* 25:1043–1049.
- Flassch J-P., Leborgne Y. 1994. Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and the effects on aquaculture production and natural settlement
- Frans I., Michiels CW., Bossier P., Willems KA., Lievens B., Rediers H. 2011. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention: Pathogen profile of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Fish Diseases* 34:643–661.
- Fronzes R., Christie PJ., Waksman G. 2009. The structural biology of type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology* 7:703–714.
- Garrido-Maestu A., Chapela M-J., Peñaranda E., Vieites JM., Cabado AG. 2014. In-house validation of novel multiplex real-time PCR gene combination for the simultaneous detection of the main human pathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*). *Food Control* 37:371–379.
- Gosling E. 2008. *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*. John Wiley & Sons.
- Gubala AJ. 2006. Multiplex real-time PCR detection of *Vibrio cholerae*. *Journal of Microbiological Methods* 65:278–293.
- Jean F., Flye-Sainte-Marie J., Oudard C., Paillard C. 2011. Handling enhances the development of brown ring disease signs in *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Shellfish Research*:xxx.
- Jensen S., Samuelsen OB., Andersen K., Torkildsen L., Lambert C., Choquet G., Paillard C., Bergh Ø. 2003. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis.
- Juhas M., Crook DW., Hood DW. 2008. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cellular Microbiology* 10:2377–2386.
- Le Bris C., Richard G., Paillard C., Lambert C., Segueineau C., Gauthier O., Pernet F., Guérard F. 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* – Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. *Fish & Shellfish Immunology* 42:16–24.
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Nicolas J-L., Gouy M., Berthe FCJ. 2004. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Diseases of aquatic organisms* 58:143.
- Low HH., Gubellini F., Rivera-Calzada A., Braun N., Connery S., Dujancourt A., Lu F., Redzej A., Fronzes R., Orlova EV., Waksman G. 2014. Structure of a type IV secretion system. *Nature* 508:550–553.
- Matsuyama T., Sakai T., Kiryu I., Yuasa K., et al. 2010. First isolation of *V. tapetis*, the etiological agent of brown ring disease (BRD), in manila clam *Ruditapes philippinarum* in Japan. *Fish Pathology* 45:77–79.
- McCleary S., Henshilwood K. 2015. Novel quantitative TaqMan® MGB real-time PCR for sensitive detection of *Vibrio aestuarianus* in *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 114:239–248.

- Mehrabadi JF., Morsali P., Nejad HR., Imani Fooladi AA. 2012. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* with new multiplex PCR. *Journal of Infection and Public Health* 5:263–267.
- Paillard C., Gausson S., Nicolas JL., le Pennec JP., Haras D. 2006. Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 253:25–38.
- Paillard C., Jean F., Ford SE., Powell EN., Klinck JM., Hofmann EE., Flye-Sainte-Marie J. 2014. A theoretical individual-based model of Brown Ring Disease in Manila clams, *Venerupis philippinarum*. *Journal of Sea Research* 91:15–34.
- Paillard C., Allam B., Oubella R. 2004. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of aquatic organisms* 59:249–262.
- Paillard C., Maes P. 1990. Etiologie de la maladie de l’anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogénicité d’un *Vibrio* sp. *Comptes rendus de l’Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie* 310:15–20.
- Paillard C., Maes P. 1994. Brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. *Diseases of aquatic organisms* 19:137–146.
- Paillard C., Maes P. 1995a. The Brown Ring Disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*, II: Microscopic study of the brown ring syndrome. *Journal of Invertebrate Pathology* 65:101–110.
- Paillard C., Maes P. 1995b. The Brown Ring Disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*, I: Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *Journal of Invertebrate Pathology* 65:91–100.
- Richard G., Bidault A., Miner P., Pernet F., Corporeau C., Boudry P., Guérard F., Paillard C., Lambert C. Study of Brown Ring Disease dynamics in *Ruditapes philippinarum* in relation with algal diet and host’s sexual maturity reveals a reproduction status effect. *in prep.*
- Richard G., Bidault A., Miner P., Pernet F., Corporeau C., Boudry P., Guérard F., Paillard C., Lambert C. Study of Brown Ring Disease dynamics in *Ruditapes philippinarum* in relation with algal diet and host’s sexual maturity reveals a reproduction status effect. *in prep.*
- Rodríguez JM., López-Romalde S., Beaz R., Alonso Mc., Castro D., Romalde JL. 2006. Molecular fingerprinting of *Vibrio tapetis* strains using three PCR-based methods: ERIC-PCR, REP-PCR and RAPD. *Diseases of aquatic organisms* 69:175–183.
- Romalde JL., Castro D., Magariños B., Lopez-Cortes L., Borrego JJ. 2002. Comparison of Ribotyping, Randomly Amplified Polymorphic DNA, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Typing of *Vibrio tapetis*. *Systematic and Applied Microbiology* 25:544–550.
- Saulnier D., De Decker S., Haffner P. 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *Journal of Microbiological Methods* 77:191–197.
- Sawabe T., Ogura Y., Matsumura Y., Feng G., Amin AR., Mino S., Nakagawa S., Sawabe T., Kumar R., Fukui Y., Satomi M., Matsushima R., Thompson FL., Gomez-Gil B., Christen R., Maruyama F., Kurokawa K., Hayashi T. 2013. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Frontiers in Microbiology* 4.
- Schikorski D., Renault T., Paillard C., Bidault-Toffin A., Tourbiez D., Saulnier D. 2013. Development of TaqMan real-time PCR assays for monitoring *Vibrio harveyi* infection

- and a plasmid harbored by virulent strains in European abalone *Haliotis tuberculata* aquaculture. *Aquaculture* 392-395:106–112.
- Sparling PF. 1983. Bacterial virulence and pathogenesis: an overview. *Review of Infectious Diseases* 5:S637–S646.
- Thompson FL., Gevers D., Thompson CC., Dawyndt P., Naser S., Hoste B., Munn CB., Swings J. 2005. Phylogeny and Molecular Identification of *Vibrios* on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5107–5115.
- Thompson FL., Thompson CC., Swings J. 2002. *Vibrio tasmaniensis*, sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Systematic and Applied Microbiology* 26:65–69.
- Vallenet D., Belda E., Calteau A., Cruveiller S., Engelen S., Lajus A., Le Fevre F., Longin C., Mornico D., Roche D., Rouy Z., Salvignol G., Scarpelli C., Thil Smith AA., Weiman M., Medigue C. 2013. MicroScope--an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Research* 41:D636–D647.
- Yamamoto S., Kasai H., Arnold DL., Jackson RW., Vivian A., Harayama S. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146:2385–2394.

Legends of the figures

Table 1

Bacterial strains used in this study isolated from different hosts and origins, and specificity of Taqman qPCR method for the detection of *virB4* gene in strains pathogenic for clams. ^a virulence *in vivo* on *Venerupis philippinarum*, ^b real-time PCR results, ^c unpublished, ^d published on Choquet thesis (Choquet, 2004), nd: not determined

Table 2

Nucleotide sequences and melting temperatures (T_m) of primers and probe designed for real-time PCR reaction, targeting the *virB4* gene.

Figure 1

Schematic view of the infection procedure.

Figure A – supplementary file

Photography of the 18 incubation tanks.

Figure 2

Photography of a) BRD- clam and b) BRD+ clam. From Richard *et al.* (Richard *et al.* *in prep*)

Figure 3

Visualization of the PCR product in agarose gel obtained with qPCR *virB4* assay for representative strains of *Vibrio*, *i.e.* which were tested positive and negative for BRD development after an infection experiment. Lanes MT corresponds to the BenchTop® DNA ladder (Promega®). T- H₂O represents the water negative control.

Figure 4

Standard curve for the detection and quantification of the *virB4* gene by Taqman real-time PCR, in dilution range of EF samples artificially spiked with CECT4600^T bacterial strain. Standard curve was generated by plotting the log cell number of bacteria present in PCR DNA template against Ct values.

Figure 5

Kinetics of clam infection by CECT4600^T *V. tapetis* strain by *virB4* real-time PCR in extrapallial fluids sampled at 0, 1, 2, 7, 14 and 30 days post-injection. 0d means not injected. * corresponds to BRD+ clam.

Figure 6

Kinetics of non-injected clams by *virB4* real-time PCR in extrapallial fluids sampled at 0, 1, 2, 7, 14 and 30 days of sampling during the experiment. * corresponds to BRD+ clam.

Figure 7

Kinetics of FSW-injected clams by *virB4* real-time PCR in extrapallial fluids sampled at 0, 1, 2, 7, 14 and 30 days of sampling during the experiment. 0d means not injected. * corresponds to BRD+ clam.

Table 1

Strain	Vibrio species	Source and location isolation	Strain reference	Virulence ^a	qPCR ^b
CECT4600 ^T	<i>V. tapetis</i>	<i>Venerupis philippinarum</i> , Landéda, France	Paillard & Maes 1995	+ ^d	+
FPC 1121	<i>V. tapetis</i>	<i>Venerupis philippinarum</i> , Japan	Matsuyama <i>et al.</i> 2010	+	-
IS 1	<i>V. tapetis</i>	<i>Venerupis philippinarum</i> , Landéda, France	Borrego <i>et al.</i> 1996	+ ^d	+
IS 5	<i>V. tapetis</i>	<i>Venerupis philippinarum</i> , Landéda, France	Borrego <i>et al.</i> 1996	+ ^d	+
IS 7	<i>V. tapetis</i>	<i>Venerupis philippinarum</i> , Quiberon, France	Borrego <i>et al.</i> 1996	+ ^d	+
IS 8	<i>V. tapetis</i>	<i>Venerupis aurea</i> , Quiberon, France	Borrego <i>et al.</i> 1996	+ ^d	+
IS 9	<i>V. tapetis</i>	<i>Cerastoderma edule</i> , Quiberon, France	Borrego <i>et al.</i> 1996	+ ^d	+
P16B	<i>V. tapetis</i>	<i>Venerupis philippinarum</i> , Morbihan Gulf, France	Allam, Paillard & Ford 2002	+ ^d	+
RD 0705	<i>V. tapetis</i>	<i>Venerupis decussatus</i> , Galicia, Spain	Novoa <i>et al.</i> 1998	+ ^d	+
RP 11.2	<i>V. tapetis</i>	<i>Venerupis philippinarum</i> , Landéda, France	Borrego <i>et al.</i> 1996	+ ^d	+
RP 2.3	<i>V. tapetis</i>	<i>Venerupis philippinarum</i> , Landéda, France	Borrego <i>et al.</i> 1996	+ ^d	+
RP 8.17	<i>V. tapetis</i>	<i>Venerupis philippinarum</i> , Landéda, France	Borrego <i>et al.</i> 1996	+ ^d	+
RP 9.7	<i>V. tapetis</i>	<i>Venerupis philippinarum</i> , Landéda, France	Borrego <i>et al.</i> 1996	+ ^d	+
UK6	<i>V. tapetis</i>	<i>Venerupis philippinarum</i> , Poole Harbour, UK	Allam <i>et al.</i> 2000	+ ^d	+
S2-2	<i>V. tapetis</i>	<i>Solea Solea</i> , Norway	Mortensen, unpublished	- ^c	-
LP2	<i>V. tapetis</i>	<i>Symphodus melops</i> , Bergen, Norway	Jensen <i>et al.</i> 2003	- ^d	-
HH6087	<i>V. tapetis</i>	<i>Hippoglossus hippoglossus</i> , Inverailort, UK	Reid <i>et al.</i> 2003	- ^d	-
LMG 20012 ^T	<i>V. tasmaniensis</i>	<i>Salmo Salar</i> L., Tasmania Australia	Thompson, Thompson & Swings 2002	- ^d	-
LMG 4042 ^T	<i>V. splendidus</i>	marine fish	Leroux <i>et al.</i> 2004	- ^d	-
LMG 19703 ^T	<i>V. shilonii</i>	<i>Oculina patagonica</i> , Mediterranean sea	Kushmaro <i>et al.</i> 2001	nd	-
LMG 20539 ^T	<i>V. kanaloe</i>	<i>Ostrea edulis</i> larvae, France	Thompson <i>et al.</i> 2003	nd	-
CIP 107166 ^T	<i>V. lentus</i>	cultivated oyster, Spain	Macian <i>et al.</i> 2001	nd	-
LMG 16745 ^T	<i>V. chagasii</i>	marine fish	Leroux <i>et al.</i> 2004	nd	-
775 (ATCC 68554)	<i>V. anguillarum</i>	<i>Oncorhynchus kisutch</i> , US Pacific Coast	Crosa, Schiewe & Falkow 1977	nd	-
02/041	<i>V. aestuarianus</i>	<i>Crassostrea gigas</i> , Argenton, France	Garnier <i>et al.</i> 2007	nd	-
P9	<i>Halomonas</i> sp. 33	<i>Venerupis philippinarum</i> , Marennes, France	Paillard <i>et al.</i> 2006	- ^d	-
CF6	<i>V. splendidus</i>	<i>Crepidula formicata</i>	Choquet 2004	- ^d	-
GM4	<i>Vibrio</i> sp.	<i>Venerupis philippinarum</i> , Morbihan Gulf, France	Paillard <i>et al.</i> 2006	- ^d	-
ORM4	<i>V. harveyi</i>	moribund abalone, France	Austin & Zhang 2006	- ^c	-

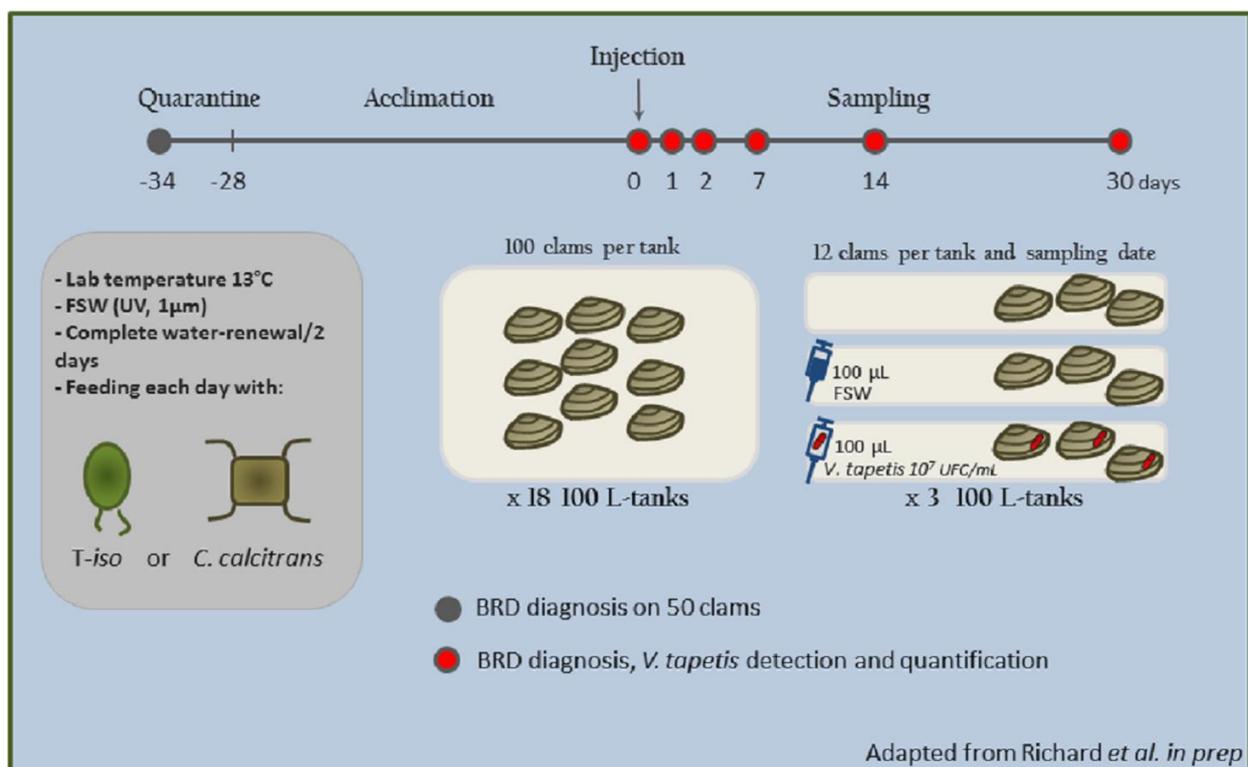
Table 2

Nucleotide sequences and melting temperatures (T_m) of primers and probe designed for real-time PCR reaction, targeting the *virB4* gene.

Description	Name	Sequence (5'-3')	T_m (°C)
Forward primer	virB4-F3	TTA-AAA-GTG-GCG-GAG-GAA-TG	58
Reverse primer	virB4-R3	AAG-CTC-TGC-ATC-GGT-TAG-GA	60
Taqman probe	virB4-P1	CGA-GTA-CCA-ACA-TGC-CTT-CCC-GT	53.7

Figure 1

Schematic view of the infection procedure.



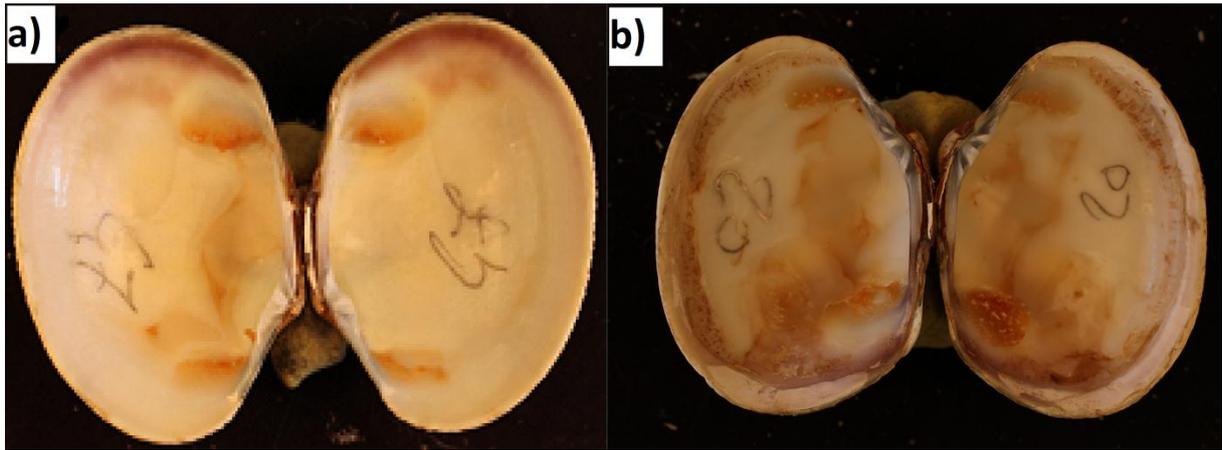


Figure 2
Photography of a) BRD- clam and b) BRD+ clam. From Richard *et al.* (Richard *et al.* *in prep*)

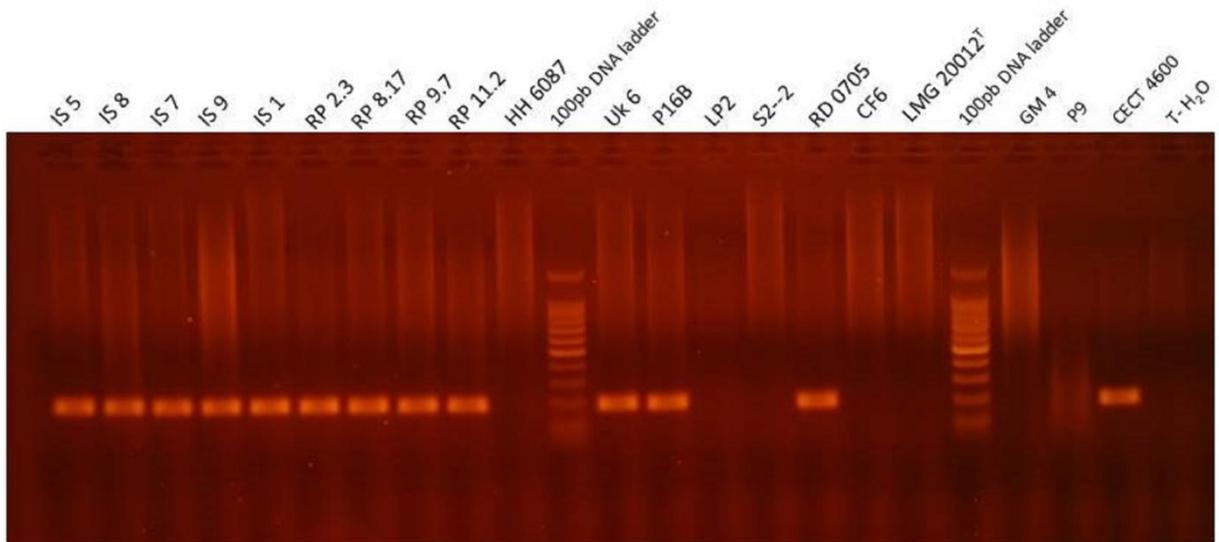


Figure 3
Visualization of the PCR product in agarose gel obtained with qPCR *virB4* assay for representative strains of *Vibrio*, *i.e.* which were tested positive and negative for BRD development after an infection experiment. Lanes MT corresponds to the BenchTop® DNA ladder (Promega®). T- H₂O represents the water negative control.

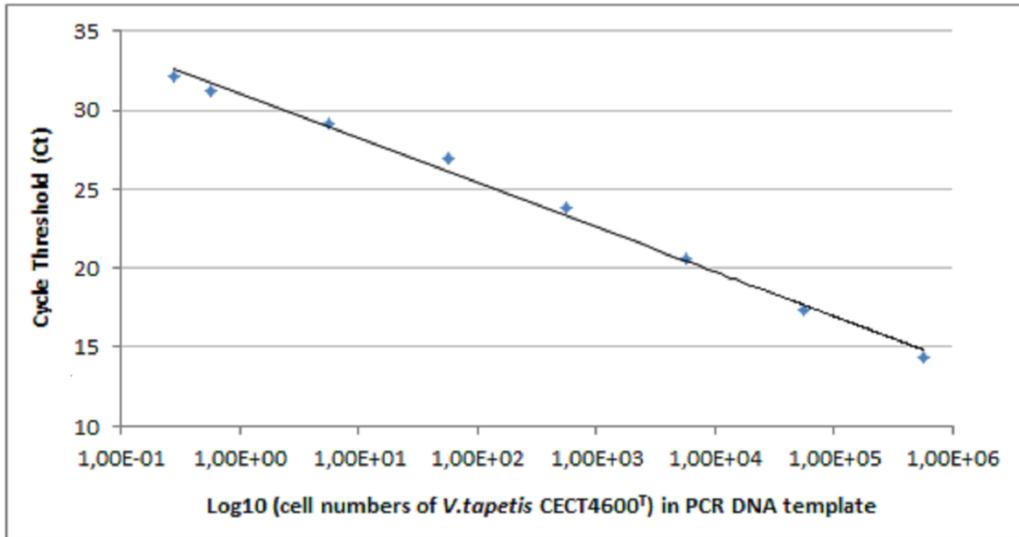


Figure 4

Standard curve for the detection and quantification of the *virB4* gene by Taqman real-time PCR, in dilution range of EF samples artificially spiked with CECT4600^T bacterial strain. Standard curve was generated by plotting the log cell number of bacteria present in PCR DNA template against Ct values.

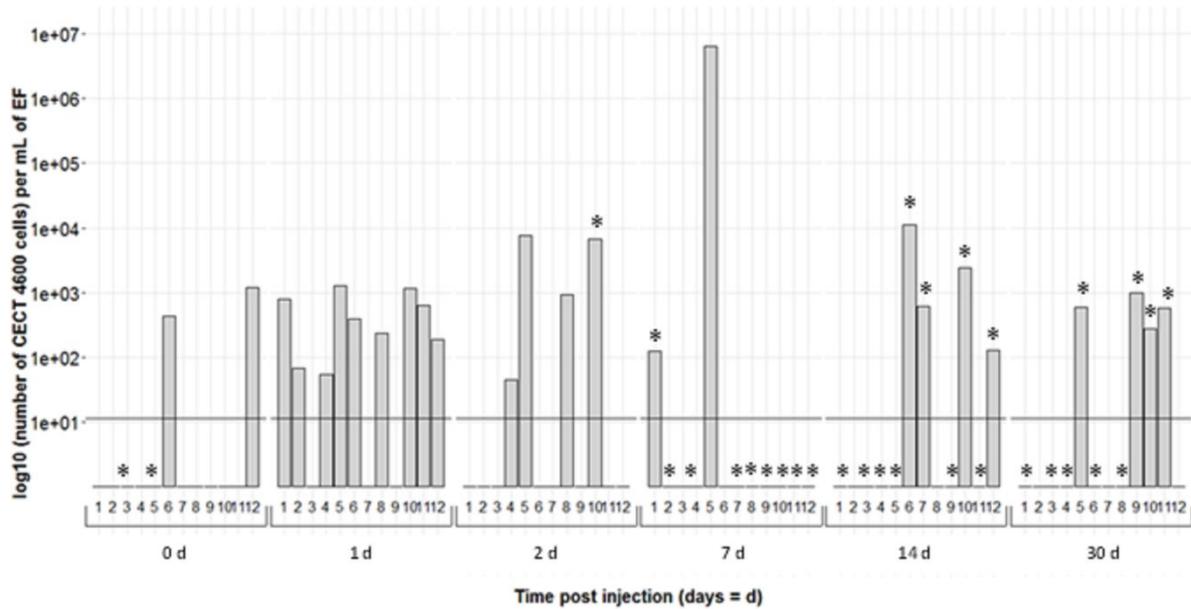


Figure 5

Kinetics of clam infection by CECT4600^T *V. tapetis* strain by *virB4* real-time PCR in extrapallial fluids sampled at 0, 1, 2, 7, 14 and 30 days post-injection. 0d means not injected. * corresponds to BRD+ clam.

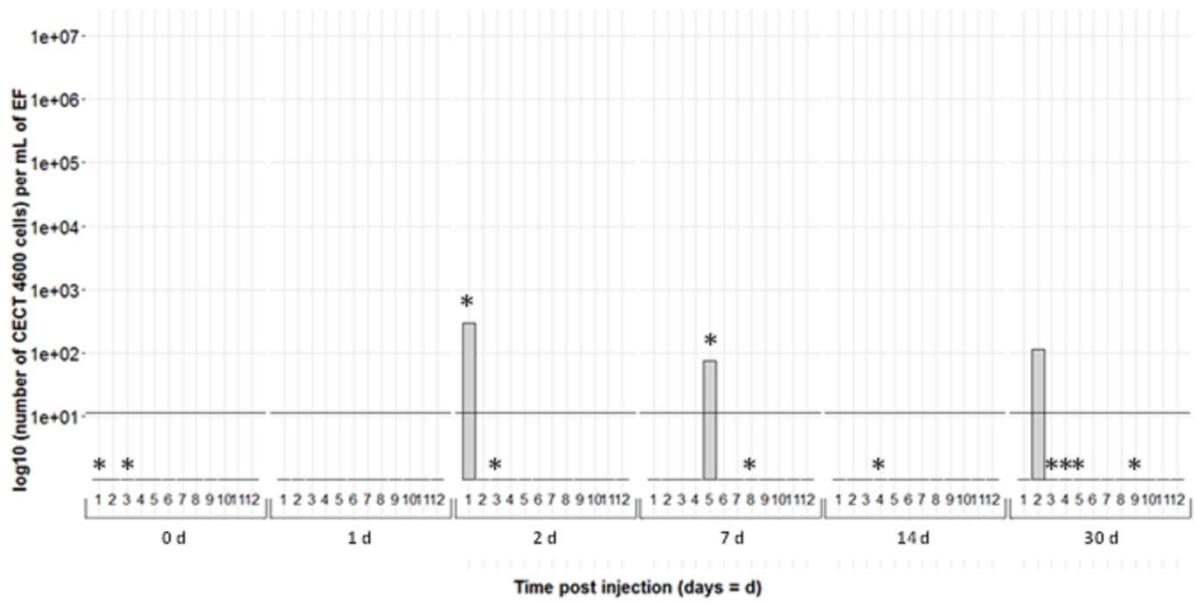


Figure 6
Kinetics of non-injected clams by *virB4* real-time PCR in extrapallial fluids sampled at 0, 1, 2, 7, 14 and 30 days of sampling during the experiment. * corresponds to BRD+ clam.

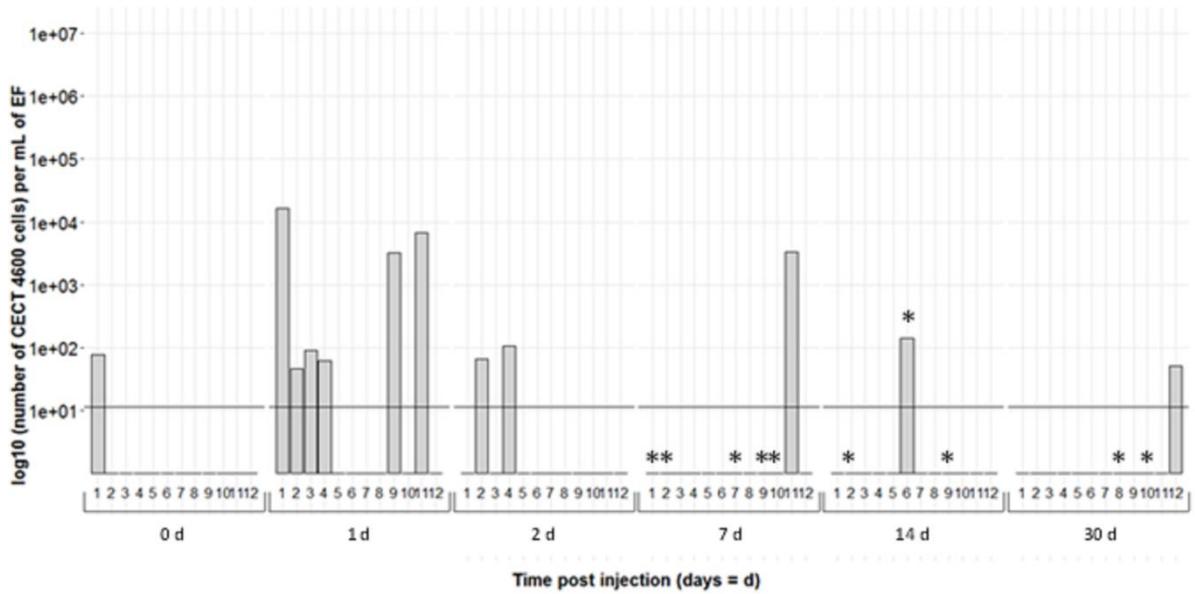


Figure 7
Kinetics of FSW-injected clams by *virB4* real-time PCR in extrapallial fluids sampled at 0, 1, 2, 7, 14 and 30 days of sampling during the experiment. 0d means not injected. * corresponds to BRD+ clam.

Approche mécanistique de la réponse de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, exposée à la bactérie *Vibrio tapetis* : influence de la température et du régime algal

Résumé

La palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, a été introduite en France en 1972 suite à une volonté de diversification de la production aquacole des bivalves. A la fin des années 1980, des épisodes de mortalité massive ont été observés dans les parcs vénériques du pays des Abers (Finistère, France). La mortalité massive des palourdes a été associée à la maladie de l'anneau brun (MAB), une vibriose dont l'agent étiologique est *Vibrio tapetis*. Le développement de la MAB en milieu naturel a été associé à la modulation de certains facteurs environnementaux tels que la température ou la présence de ressource trophique. Dans le cadre de ce travail et dans un premier temps, des infections expérimentales de palourdes avec différentes souches de *V. tapetis* ont été effectuées conjointement à une acclimatation des animaux à deux températures contrastées. L'augmentation de la température de 15 à 22 °C a été associée à de plus fortes activités enzymatiques de la superoxyde dismutase (SOD), impliquée dans le système antioxydant, et de la phénoloxydase (PO), impliquée dans le système immunitaire inné. L'augmentation de la température a également conduit à une diminution de la virulence de *Vibrio tapetis*. Ensembles, ces résultats permettent d'expliquer la baisse de la prévalence et de l'intensité de la MAB à 22 °C. Dans un second temps, des palourdes sexuellement matures nourries avec deux algues contrastées en termes de composition lipidique ont été infectées par *V. tapetis*. Si la qualité des microalgues n'a pas conduit à des différences de prévalence et d'intensité de la MAB, le statut de reproduction des animaux a eu une influence sur l'intensité de la maladie. Les réponses métaboliques de *R. philippinarum* exposée à *V. tapetis* n'ont pas été influencées par la qualité de la nourriture mais par le développement de la MAB. Ces réponses consistaient en une modulation de l'activité d'enzymes antioxydantes (SOD, catalase, glutathion peroxydase, glutathion réductase, glutathion-S-transférase) et d'enzymes reliées au système immunitaire inné (PO et oxyde nitrique synthase inductible) en fonction de la présence de signes cliniques de la MAB. Finalement, l'utilisation de ces indicateurs biochimiques pourrait permettre d'établir des critères de sélection d'individus résistants à la MAB.

Mots clés : *Ruditapes philippinarum* ; enzymes antioxydantes ; phénoloxydase ; oxyde nitrique synthase inductible ; *Vibrio tapetis* ; maladie de l'anneau brun ; température ; microalgue ; résistance ; immunité

Mechanistic study of the response of Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, exposed to the bacterium *Vibrio tapetis* : temperature and algal diet effects

Abstract

The Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, was introduced in France in 1972 following the willingness of bivalve aquaculture diversification. In the late 1980s, episodic mass mortality events were observed in ponds of the "Pays des Abers" region (Finistère, France). The massive mortality of clams was associated brown ring disease (BRD), a vibriosis which causative agent is *Vibrio tapetis*. BRD development in field has been associated with the modulation of environmental factors such as temperature or the presence of trophic resource. Firstly in the frame of the present work, experimental infections of clams with different strains of *V. tapetis* were performed together with animal acclimation at two contrasted temperatures. The increase of temperature from 15 to 22 °C was associated with higher enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), involved in the antioxidant system, and the phenoloxidase (PO), involved in the innate immune system. Temperature increase also led to a decrease in virulence of *V. tapetis*. Together, these results might explain the decline in BRD prevalence and intensity observed at 22 °C. Secondly, sexually mature clams fed with two microalgal diets contrasted in terms of lipid composition were infected with *V. tapetis*. Although microalgae quality did not lead to any difference in BRD prevalence and intensity, the reproductive status of clams influenced BRD intensity. Metabolic responses of *R. philippinarum* exposed to *V. tapetis* were not influenced by the food quality but mainly by BRD development. These responses consisted in a modulation of the activity of antioxidant enzymes (SOD, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase) and enzymes related to innate immune system (PO and inducible nitric oxide synthase) according to the presence of BRD clinical signs. Finally, the use of these biochemical indicators could allow for new criteria for selection of BRD resistant clams.

Keywords: *Ruditapes philippinarum*; antioxidant enzymes; phenoloxidase; inducible nitric oxide synthase; *Vibrio tapetis*; brown ring disease; temperature; microalgae; resistance; immunity