



HAL
open science

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

Nolwenn Trinkler

► **To cite this version:**

Nolwenn Trinkler. 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. Interactions entre organismes. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2009. Français. NNT : . tel-00543317

HAL Id: tel-00543317

<https://theses.hal.science/tel-00543317>

Submitted on 6 Dec 2010

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

Nolwenn Trinkler

Préparée à l'Institut Universitaire Européen
de la Mer, au Laboratoire des Sciences de
L'environnement Marin (LEMAR)

La guérison coquillière :
Un mécanisme de défense
de la palourde japonaise
Ruditapes philippinarum **face**
au *Vibrio tapetis* dans le
cadre de la maladie de
l'anneau brun

Thèse soutenue le 24/11/2009

devant le jury composé de :

Christian MILET

Maître de conférences, MNHN, Paris, Rapporteur

Nathalie COCHENNEC-LAUREAU

Cadre de recherche, IFREMER Nantes, Rapporteur

Vianney PICHÉREAU

Professeur, LEMAR-IUEM, Président du Jury

Jean-Marc LEBEL

Professeur, Université de Caen, Examineur

Susan E. FORD

Professeur émérite, Rutgers university (USA), Examineur

Christine PAILLARD

Chargé de recherche CNRS, LEMAR-IUEM, Directeur de thèse

Maylis LABONNE

Ingénieur de recherche IRD, LEMAR-IUEM, Membre invité

Frédéric MARIN

Chargé de recherche CNRS, Université de Bourgogne, Membre
invité

Jean-François BARDEAU

Chargé de recherche CNRS, Université du Maine, Membre invité

Je voudrais tout d'abord adresser un très grand merci à toutes les personnes qui m'ont soutenue pendant ces trois années de thèse, mais aussi durant toutes mes études.

Je tiens à remercier Christine Paillard ma directrice de thèse, chargée de recherche au CNRS (LEMAR), et Maylis Labonne ma co-directrice scientifique, ingénieur de recherche à l'IRD (LEMAR), qui m'ont encadrée durant ces 3 années de thèse.

Je remercie Christian Milet (MNHN Paris) et Nathalie Cochenec-Laureau (IFREMER Nantes) qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Un grand merci également aux autres membres du Jury : Christine Paillard (LEMAR, IUEM), Vianney Pichereau (LEMAR, IUEM), Jean-Marc Lebel (Université de Caen), Susan E. Ford (Rutgers university, USA), Maylis Labonne (IRD de Bretagne), Frédéric Marin (Université de Bourgogne) et Jean-François Bardeau (Université du Maine).

Je voudrais remercier toutes les personnes de l'équipe 3 du LEMAR et en particulier ceux qui m'ont aidé lors de mes expérimentations : Adeline Toffin, Christine Paillard, Christophe Lambert, Nelly Le Goïc, Philippe Soudant, Fanny Jeffroy, Jonathan Flye-Sainte-Marie ...

Je tiens à remercier également tous les membres de l'équipe 4 et de l'ex LASAA. Votre aide m'a été très précieuse. Je remercie particulièrement Maylis Labonne, Aurélie Jolivet, Hélène de Pontual, Ronan Fablet, Eric Dabas, Jean-Marie Munaron et Eric Morize qui m'ont aidé dans mes recherches.

Je remercie aussi le personnel du Laboratoire de Physique de l'Etat Condensé de l'Université du Maine. Travailler chez vous a été une expérience professionnellement mais aussi personnellement très enrichissante. Je remercie particulièrement Jean-François Bardeau, Nicolas Delorme et Yann Bulois (le monde est petit).

Je voudrais dédier un ENORME merci au personnel du laboratoire de Biogéosciences de l'Université de Bourgogne. Cette expérience m'a beaucoup appris tant au niveau professionnel que personnel. Je ne remerciais jamais assez Frédéric Marin qui m'a accompagnée pendant toute la deuxième moitié de ma thèse. Je remercie également

Nathalie Guichard, Nathalie Le Roy, Benjamin Marie, Paula Sequiera Silva et Gilles Luquet.

Je remercie également Gérard Siquin (UBO), Philippe Crassous (Ifremer, Brest), Claudie Josse et Aline Bonnotte (Université de Bourgogne) pour m'avoir permis de faire des observations aux Microscopes électroniques à balayage, Marcel Bohn (Ifremer, Brest) qui m'a permis de faire des mesures à la microsonde, et Laurent Plasseraud (Université de Bourgogne) qui m'a permis de passer des échantillons aux FTIR.

Je voudrais remercier le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche pour mon allocation de recherche, ainsi que toutes les personnes qui de près ou de loin ont financé cette thèse.

Je voudrais également remercier les personnes qui ont participé à mes comités de thèse interne et Externe.

Par ailleurs, je tiens à remercier le département de Biologie de l'UBO ainsi que le CIES de m'avoir permis de faire un monitorat pendant ces trois ans. C'était très intéressant et très formateur.

Un grand merci aussi à Geneviève Cohat, Anne-Sophie Podeur, Monique Brian et Agnès Petiot pour leur disponibilité et leur bonne humeur.

Enfin je tiens à remercier tous mes amis de Brest ou d'ailleurs, mais aussi Tudal et Michaël. Sans vous la vie aurait été moins belle pendant ces 3 années.

Sommaire

Sommaire	5
Liste des abréviations	8
Introduction	11
Chapitre 1. Revue des connaissances	15
1. La biominéralisation-Généralités	15
1. 1. Qu'est-ce que la biominéralisation ?	15
1. 2. Les impacts de la biominéralisation sur la biosphère.....	16
1. 3. Les origines de la biominéralisation.....	18
1. 4. Les différentes composantes des tissus minéralisés.....	22
1. 5. Les processus généraux de la biominéralisation	30
2. La biominéralisation chez les mollusques.....	33
2. 1. Introduction à la biominéralisation des mollusques.....	33
2. 2. La phylogénie des mollusques	36
2. 3. Les minéralisations chez les solénogastres, caudofovéates, polyplacophores, monoplacophores et scaphopodes	38
2. 4. Les céphalopodes, bivalves et gastéropodes : la formation de la coquille.....	45
2. 5. La réparation coquillière des mollusques.....	74
3. La palourde japonaise <i>Ruditapes philippinarum</i> et les altérations coquillières liées à la maladie de l'anneau brun	83
3. 1. Qu'est-ce qu'une palourde japonaise ?	83
3. 2. La biominéralisation de la palourde japonaise.....	95
3. 3. La Maladie de l'Anneau Brun (MAB) et ses altérations sur la biominéralisation de la palourde japonaise	96
3. 4. La guérison de la palourde par la réparation coquillière.....	116
Chapitre 2. Résistance de la palourde japonaise <i>Ruditapes philippinarum</i> face à la Maladie de l'Anneau Brun : une étude de stocks sélectionnés montrant un processus de guérison par la réparation coquillière.....	119
Article 1: Resistance to Brown Ring Disease in the Manila clam, <i>Ruditapes philippinarum</i> : a study of selected stocks showing a recovery process by shell repair.....	119
Chapitre 3. La phase minérale de la réparation coquillière chez la palourde japonaise <i>Ruditapes philippinarum</i> affectée par la Maladie de l'Anneau Brun : une étude utilisant la	

micro-spectrométrie Raman confocale, le microscope électronique à balayage et une coloration des cellules hémocytaires.....	130
Article 2: Mineral phase in the shell repair in the Manila clam <i>Ruditapes philippinarum</i> affected by the Brown Ring Disease: a Raman micro-spetrometry, scanning electron microscopy and hemocyte cellular study	130
Chapitre 4. La réparation coquillière de la palourde face à la Maladie de l'Anneau Brun : une étude de la matrice organique en utilisant la micro-spectrométrie Raman confocale et la microsonde WDS	163
Article 3 : Clam shell repair from the Brown Ring Disease: a study of the organic matrix using Confocal Raman micro-spectrometry and WDS microprobe.....	163
Chapitre 5. La variabilité de la réparation coquillière chez la palourde japonaise <i>Ruditapes philippinarum</i> affectée par la Maladie de l'Anneau Brun : une étude biochimique, sérologique et microstructurale.....	178
Article 4: Variability of Shell repair in the Manila clam <i>Ruditapes philippinarum</i> affected by the Brown Ring Disease: a study on the organic shell matrix	178
Article 5: Shell repair in the clam <i>Ruditapes philippinarum</i> , affected by the Brown Ring Disease (BRD): a biochemical and serological study	178
Conclusion et perspectives	214
1. Les mécanismes de résistance de la palourde face à la Maladie de l'Anneau Brun ..	214
2. Les palourdes japonaises non symptomatiques.....	215
3. L'apparition et la description du dépôt brun	216
4. La réparation coquillière	216
Annexe 1 - Techniques d'observation.....	221
1. Introduction	221
2. Le Microscope Électronique à Balayage (MEB)	221
2. 1. Introduction	221
2. 2. Histoire	221
2. 3. Principe.....	221
2. 4. Applications	224
3. La micro-spectrométrie Raman	225
3. 1. Introduction	225
3. 2. Historique	225
3. 3. Principe.....	226
3. 4. Applications	228

4. La microsonde WDS (Wavelength Dispersive Spectroscopy)	229
4. 1. Introduction	229
4. 2. Historique	229
4. 3. Principe.....	229
4. 4. Applications	231
Annexe 2- Experimental infections of corkwing wrasse, <i>Symphodus melops</i> , and Manila clam, <i>Ruditapes philippinarum</i> , with three <i>Vibrio tapetis</i> and <i>V. tapetis</i> – like isolates. <i>In Prep</i> ...	232
Annexe 3- Le nouveau chapitre de thèse 2009	243
Références bibliographiques	265

Liste des abréviations

A : Adulte
AFM : Microscope à Force Atomique
ANOVA : Analyse de la variance
Asp : Acide Aspartique
ATER : Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche
BCA : Bicinchonic Acid
BE : Bourrelet Externe
BI : Bourrelet Interne
BM1 : Bourrelet Médian primaire
BM2 : Bourrelet Médian secondaire
BR : Brown Ring
BRD : Brown Ring Disease
C : Carbone
C : Centrale
C : Clam
Ca : Calcium
CaCO₃ : Carbonate de Calcium
CCD : multichannel Charge-Coupled Device array
CDG : Conchiolin Deposit Group
CDS : Conchiolin Deposit Stage
CECT : Collection Espagnole de Cultures Types
CEF : Central Extrapallial Fluid
CFU : Colony Forming Unit
CHT : Concentration Hémocytaire Totale
CI : Couche Interne
CIES : Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur
CIFRE : Conventions Industrielles de Formation par la REcherche
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique
CO₂ : Dioxyde de carbone
CPM : Monocanal type PhotoMultiplicateur
CPR : Couche Prismatique
D : Day
D : Dépôt brun
D : Dimension (1D, 3D)
DEB : Dynamic Energy Budget
DOPA : 3,4-DihydroxyPhénylAlanine
EDS : Energy Dispersive X-ray Spectrometry
EDTA : Acide EthylèneDiamineTetracétique
EF : Extrapallial Fluid
ELISA : Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EPMA : Electron Probe MicroAnalyser
EPS : ExtraPallial Space
FAO : Food and Agriculture Organization
FE : Fluide Extrapalléal
FEC : Fluide Extrapalléal Central
FEP : Fluide Extrapalléal Périphérique
FTIR : Fourier Transform Infra-Red
HCO₃⁻ : Bicarbonate

HE : HEmolymph
HS : High Sensible
I : Inner
IE : Inner Epithelium
IF : Inner Fold
IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
IM : Insoluble Matrix
IMH : Insoluble Matrix of Healthy shells
IMR : Insoluble Matrix of Repaired zones
IP : Impression Palléale
IRD : Institut de Recherche et de Développement
IUEM : Institut Universitaire Européen de la Mer
J : Juvénile
JOD : Juvenile Oyster Disease
LAP : Leucine AminoPeptidase
LASAA : Laboratoire de Sclérochronologie des Animaux Aquatiques
LEMAR : Laboratoire des Sciences de l'Environnement MARin
LP : Lame Périostracale
LPM : Longitudinal Pallial Muscle
LS : Low Sensible
LSB : Laemmler Sample Buffer
M : molecular weight Markers
MA : Million d'Années
MAB : Maladie de l'Anneau Brun
MBC : Minéralisation Biologiquement Contrôlée
MC : Mucus Cell
MEB : Microscope Electronique à Balayage
MET : Microscope Electronique à Transmission
MF : Middle Fold
MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle
MRS : Materials Research Society
MSX : Multi-nucleated Sphere X
N : Number
Na : sodium
NC : NaCreous shell layer
O : Outer
O₂ : Dioxygène
OE : Outer Epithelium
OF : Outer Fold
P : Périostracum
Pa : Périphérique antérieure
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEF : Peripheral Extrapallial Fluid
PG : Periostracal Groove
PL : Pallial Line
PM : Pallial Muscle
PN : Pallial Nerve
PO : PhenolOxydase
Pp : Périphérique postérieure
PR : PRismatic shell layer

Pv : Périphérique ventrale
RNA : RiboNucleic Acid
S : Sinusale
S : Soufre
SA : Sub-Articulaire
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SEM : Scanning Electron Microscopy
SM : Soluble Matrix
SMH : Soluble Matrix of Healthy Shells
SMR : Soluble Matrix from Repaired zones
SP : Sillon Périostracal
Sr : Strontium
SRS : Shell Repair Stage
SSW : Sterile SeaWater
T : Time
TBS : Tris-Buffered-Saline
TP L2 : Travaux Pratiques de Licence 2
UBO : Université de Bretagne Occidentale
USA : United States of America
UV: Ultraviolet
VP1 : *Vibrio* Prédominant 1
W : Weight
WDS : Wave-length Dispersive Spectrometry
XANES : Scanning X-ray microscope

Introduction

Depuis l'apparition de la vie sur la Terre il y a 3.5 milliards d'années, les organismes se sont protégés des agressions de l'environnement et des autres organismes vivants en formant des pièces dures grâce au processus de biominéralisation. Ces agressions pouvaient être la dessiccation, les UV, la gravité, la prédation et la compétition. C'est ainsi qu'au début de l'histoire de la vie apparaissaient les stromatolithes formés par des cyanobactéries (Lowenstam et Weiner, 1989 ; Simkiss et Wilbur, 1989).

Par la suite, au Cambrien, il y a 544 millions d'années, tous les grands groupes de métazoaires présents actuellement sont apparus, et ont formé des pièces calcifiées, qui ont ensuite fossilisé. Ainsi des fossiles de squelettes de vertébrés, mais aussi d'exosquelettes d'invertébrés ont été retrouvés. Ces invertébrés étaient des éponges, des coraux, des brachiopodes, des mollusques et des échinodermes. Certains invertébrés étaient donc capables de produire des exosquelettes de carbonate de calcium, formant ainsi une structure de soutien des tissus mous (Lowenstam et Weiner, 1989 ; Simkiss et Wilbur, 1989).

Par exemple, les coquilles de mollusques sont des exosquelettes formés d'environ 95% (w/w) de carbonate de calcium, mais également de 5% (w/w) au plus de matrice organique. Le carbonate de calcium de ces coquilles présente différentes formes ou polymorphes. Par exemple des cristaux d'aragonite sont présents chez *Mercenaria mercenaria* (Taylor et al., 1973), de calcite chez *Crassostrea virginica* (Carriker, 1996) et de vaterite dans les perles de culture d'eau douce de *Hyriopsis cumingu* et *H. schlegeli* (Jacobs et al., 2008). La matrice organique associée est principalement constituée de protéines, de polysaccharides et de lipides. Elle joue un très grand rôle dans la régulation, la structuration, la nucléation et l'inhibition de la calcification, ainsi que dans l'orientation et la détermination de la nature des cristaux de carbonate. Pour ce faire, cette matrice forme un moule, une trame en 3D dans laquelle les cristaux de calcium prennent place. Chez les mollusques, la biominéralisation se produit à l'interface entre le manteau et la coquille, au niveau des espaces extrapalléaux. Les mollusques protègent ces compartiments de l'environnement. Pour ce faire, ils sécrètent du mucus et leur manteau fait des mouvements péristaltiques dans le but d'enlever les corps étrangers que sont par exemple les grains de sable, ou les microorganismes (Lowenstam et Weiner, 1989 ; Simkiss et Wilbur, 1989 ; Marin *et al.*, 2008). Il arrive que des particules ne puissent être éliminées de ces zones. Elles peuvent alors être recouvertes par une nouvelle couche de tissu minéralisé. Ce phénomène est appelé « nacrésation » chez les mollusques

Introduction

nacrés (mollusques sécrétant de la nacre aragonitique) et correspond à un processus de réparation coquillière. Il est par exemple observé lors du recouvrement de trématodes comme *Gymnophallus margariferum* et de polychètes comme *Polydora spp.* Ce phénomène est très proche de celui de la formation des perles par les huîtres perlières *Pinctada sp.* (Cheng, 1967 ; Malek et Cheng, 1974 ; Arnaud-Haond et al., 2007 ; Taylor et Strack, 2008).

Un processus particulier de réparation coquillière se déroule chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*, qui est un bivalve hétérodonte (Paillard et al., 1994). Ses deux valves sont composées de cristaux d'aragonite et présentent deux couches coquillières (Taylor et al., 1973). La couche interne a une microstructure homogène et la couche externe a une microstructure composite prismatique (Boggild, 1930a ; Shimamoto, 1986).

La palourde japonaise est l'une des principales espèces de bivalve cultivées dans le monde. En 2007, plus de trois millions de tonnes de palourdes ont été produites. De plus, son prix par unité de poids était alors 4 à 5 fois plus élevé que celui des huîtres et des moules (Gouletquer, 2006). C'est pourquoi sa production est très importante socio-économiquement. La palourde japonaise est originaire de l'océan Indopacifique et a été introduite en Europe pour l'aquaculture entre 1972 et 1985 : en France entre 1972 et 1975, en Angleterre en 1980, en Espagne et en Italie en 1985 (Breber, 1985 ; Flassch et Leborgne, 1992). La principale raison de cette importation est sa croissance relativement plus rapide par rapport à la palourde européenne *R. decussatus*. Jusqu'à 1987, sa production était restée en hausse (500t en 1987 contre 200t en 1989 en France).

Depuis 1987, la palourde japonaise est sujette à une infection récurrente, provoquée par une bactérie nommée *Vibrio tapetis* (Paillard et Maes, 1990 ; Borrego *et al.*, 1996). Cette infection bactérienne est caractérisée par la formation d'un anneau brun, qui est à l'origine de la terminologie « la Maladie de l'Anneau Brun (MAB) ». Cet anneau est situé sur la face interne des valves, où se déroule la biominéralisation (Paillard et Maes, 1990). En 1987, de fortes mortalités dues à cette maladie ont été observées sur le site de Landéda, dans le Finistère nord, qui était alors le premier site de production en France (Paillard et Maes, 1990 ; Flassch *et al.*, 1992). Depuis lors, la MAB a totalement décimé les cultures de palourdes en Bretagne. Et, jusqu'à aujourd'hui, la conchyliculture de la palourde japonaise n'a pas repris dans certains sites très affectés comme celui de Landéda. L'épizootie de la MAB n'est pas localisée qu'en Bretagne, mais touche également toute la côte européenne, à cause des transferts de palourdes liés à l'aquaculture (Paillard, 2004a).

Introduction

Les différentes étapes de la MAB ont déjà été décrites lors de travaux antérieurs (Paillard et Maes, 1995a, b). La bactérie *V. tapetis* rentre dans la cavité palléale puis colonise le périostracum. Ce phénomène modifie le processus normal de la biominéralisation coquillière. La réponse de l'hôte face à cette attaque est la production et l'accumulation d'une matrice organique brune sur la face interne des valves. A ce niveau, la bactérie envahit souvent le système circulatoire de la palourde, qui meurt ensuite de septicémie. Cependant, quelques spécimens peuvent guérir de cette infection en sécrétant une nouvelle couche minéralisée qui recouvre l'anneau brun (Paillard *et al.*, 1994 ; Paillard et Maes, 1995a, b). Ce phénomène particulier de réparation coquillière n'est pas bien connu. C'est l'un des premiers phénomènes de réparation coquillière décrits après une attaque bactérienne.

Le but de ce travail de thèse est de comprendre et caractériser comment les palourdes japonaises sont capables de résister à la Maladie de l'Anneau Brun, principalement en étudiant le mécanisme de réparation coquillière. Pour ce faire, l'étude a été faite à différentes échelles : populationnelle, individuelle, microstructurale, cellulaire, moléculaire et ionique. Les résultats de cette étude seront ensuite utilisés lors de la sélection de familles de palourdes japonaises résistantes à la MAB, afin de relancer de manière stable la vénériculture de cette espèce en Europe.

Le **premier chapitre** de ce manuscrit est une synthèse bibliographique organisée en trois parties : des généralités sur la biominéralisation, la biominéralisation chez les mollusques et la biominéralisation chez la palourde japonaise et ses altérations liées à la MAB.

Dans le **deuxième chapitre**, trois générations de palourdes japonaises peu et hautement sensibles à la MAB ont été suivies. L'évolution de leurs symptômes a été suivie dans le milieu naturel, ainsi qu'en laboratoire après des infections expérimentales. Ces résultats ont mis en évidence les capacités de résistance des 2 stocks de palourdes peu et hautement sensibles à la MAB. Le mécanisme de résistance le plus fréquent est la guérison par la réparation coquillière. Un autre mécanisme de résistance est lié aux palourdes asymptomatiques. Dans le but de comprendre la réparation coquillière, des observations microscopiques ont été faites à l'aide d'un Microscope Electronique à Balayage (MEB), sur la surface interne des valves de palourdes peu et hautement sensibles.

Le **troisième chapitre** présente la caractérisation la partie minérale de la coquille de la palourde japonaise. Pour ce faire, les techniques expérimentales que sont le MEB et la microspectrométrie Raman confocale ont été utilisées. De plus, les sels insolubles de carbonate de calcium ont été suivis dans les hémocytes de l'hémolymphe et des fluides extrapalléaux à l'aide de la coloration de Von Kossa. Afin de bien comprendre le phénomène de réparation coquillière, ces travaux ont été effectués en parallèle chez des palourdes japonaises non symptomatiques, des palourdes présentant un dépôt brun, ainsi que chez des palourdes réparant leurs coquilles.

Le but du **chapitre quatre** est de caractériser et de quantifier la matrice organique présente dans la couche de réparation coquillière de la palourde japonaise et de comparer les résultats avec ceux obtenus aux niveaux des couches internes saines et du dépôt brun. Pour ce faire, différentes techniques analytiques ont été utilisées : la microspectrométrie Raman confocale, la microsonde WDS (« Wave-length Dispersive Spectrometry ») ainsi que des extractions et des quantifications de matrices organiques coquillières.

Le but du **cinquième chapitre** est de poursuivre la caractérisation de la matrice organique présente dans la couche de réparation coquillière à une échelle biochimique. Ainsi les matrices organiques coquillières extraites de zones saines, malades et réparées de valves de palourdes japonaises ont été comparées. Ces matrices ont été extraites, puis quantitativement et qualitativement comparées en utilisant des gels d'électrophorèses 1D et des comparaisons sérologiques : tests ELISA et western blots. Pour ce faire, des anticorps polyclonaux ont été utilisés. Ils étaient ciblés contre des fractions de matrices organiques de différents mollusques mais aussi de palourdes saines. La synthèse des anticorps ciblés contre la matrice organique coquillière de palourdes non symptomatiques a été réalisée pendant cette thèse. Par ailleurs, l'étude microstructurale de la couche de réparation coquillière a été approfondie pendant cette étude à l'aide d'un MEB.

Chapitre 1. Revue des connaissances

1. La biominéralisation-Généralités

1. 1. *Qu'est-ce que la biominéralisation ?*

Le terme « biominéralisation » désigne tout processus au cours duquel des organismes vivants forment du minéral. Ces minéraux sont principalement inorganiques comme les cristaux de phosphate de calcium constituant les os, mais également organiques comme les minéraux constituant les cailloux rénaux. La biominéralisation est donc un domaine véritablement pluridisciplinaire concernant à la fois les biologistes, les médecins, les chimistes, les géologues et les physiciens. Même si la majorité des organismes ne minéralise pas, ce phénomène est très fréquent et très varié. En effet, des organismes aussi bien procaryotes qu'eucaryotes sont capables de minéraliser. De plus, les organismes vivants capables de biominéraliser sont présents dans plus de 50 phylums différents (des eubactéries aux mammifères) et peuvent produire une soixantaine de types de minéraux différents (tableau 1). Ces minéraux sont dits « biogéniques » car ils sont synthétisés par des êtres vivants (Lowenstam et Weiner, 1989).

Les principaux rôles de la biominéralisation sont le soutien et la protection des tissus mous constituant les organismes vivants, et ceci grâce aux propriétés mécaniques des pièces minéralisées. Elle a également d'autres fonctions comme la prédation, la locomotion et l'orientation. Ces pièces minéralisées sont par exemple les exosquelettes des invertébrés et les squelettes et dents des vertébrés. Toutes les fonctions liées à la minéralisation confèrent aux organismes minéralisants des avantages adaptatifs majeurs qui ont permis l'apparition et le maintien de grands phylums au cours de l'évolution du vivant comme les mollusques ou les vertébrés. La fossilisation des pièces minéralisées a permis d'étudier cette évolution, même à des temps géologiques très anciens. La biominéralisation est apparue il y a 3,465 milliard d'années avec la formation des stromatolithes par les cyanobactéries. C'est la plus ancienne trace de vie. La biominéralisation a tout de suite modifié la géologie terrestre. En effet, beaucoup de minéraux biogéniques sont formés à grande échelle dans la biosphère. Ils ont donc un impact très important sur la chimie des océans en modifiant les cycles biogéochimiques, au niveau de la colonne d'eau, du sédiment et des roches sédimentaires. Ces modifications ont pour principales origines des organismes comme les diatomées et les coccolithophoridés (Lowenstam et Weiner, 1989 ; Simkiss et Wilbur, 1989).

L'étude de la biominéralisation est très importante. Un des exemples de son application est le travail sur les maladies affectant les squelettes et les dents des vertébrés, comme les caries dentaires, la fracture des os, la perte du minéral osseux ainsi que les cailloux rénaux (Lowenstam et Weiner, 1989). Un autre exemple est l'étude des altérations coquillères que peuvent avoir certains mollusques économiquement intéressants. C'est le cas de la palourde japonaise, affectée par la Maladie de l'Anneau Brun. Ce cas nous intéresse ici particulièrement.

1. 2. *Les impacts de la biominéralisation sur la biosphère*

La biominéralisation, qui se produit à grande échelle (12 ordres de magnitude du nano au kilomètre), influence directement la chimie de nombreux écosystèmes.

1. 2. 1. Les écosystèmes des eaux continentales

La biominéralisation influence la chimie des eaux continentales. Par exemple, le protozoaire d'eau douce *Loxodes sp.* produit des granules sphériques intracellulaires de sulfate de Barium. Ces protozoaires sont très abondants dans certains lacs et peuvent y modifier le cycle biogéochimique du Barium (Finlay et al., 1983). De plus, les diatomées d'eau douce ont un rôle direct sur le cycle de la silice des lacs (Reynolds, 1986).

1. 2. 2. Les écosystèmes continentaux

La biominéralisation influence aussi les environnements continentaux. En effet, sur les continents, les bactéries et les champignons, en particulier les champignons symbiontes des lichens, ont un rôle actif dans les processus d'effritement des roches et des sols (Ehrlich, 1981). Par exemple, les champignons des lichens crustoses, décomposent chimiquement les substrats rocheux sur lesquels ils vivent par une dissolution acide. Ces acides peuvent être des composés phénoliques et de l'acide oxalique. Ensuite certains organismes, comme par exemple les lichens, sont capables de former des minéraux biogéniques à partir des produits de dégradation de ces effritements. Cette minéralisation est induite et le minéral produit dépend de la nature du substrat rocheux qui a été dissout. Par exemple, *Pertusaria corallina* forme principalement des weddellites et des oxalates de manganèse, mais peut également former de la ferrihydrite sur les roches volcaniques riches en fer (Jones et Wilson, 1986).

Par ailleurs, certaines plantes forment de grandes quantités de silice (opale, Tableau 1) (Voronkov et al., 1975). Cette silice s'accumule ensuite en grandes quantités dans certains sols. De plus, des processus continentaux, qui semblent totalement inorganiques comme la

formation du désert, sont en fait régulés par des organismes (principalement des procaryotes) qui précipitent des minéraux de fer et de manganèse (Dorn et Oberlander, 1982). L'impact de la biominéralisation sur les environnements continentaux est moins connu et est moins étendue que celui sur les environnements océaniques (Lowenstam, 1974 ; Whitfield et Watson, 1983).

1. 2. 3. Les écosystèmes océaniques

Une grande partie du *carbonate de calcium* biogénique mondial est formée à grande échelle dans les océans notamment dans les eaux de surface. Ce minéral est principalement formé par les coccolithophoridés (calcitiques), les foraminifères (calcitiques) et les ptéropodes : des gastéropodes nectoniques (aragonitiques). Malgré cette biominéralisation intense, les eaux de surface restent sursaturées en calcite et en aragonite. Ensuite, ces exosquelettes sédimentent vers le fond des océans, puis sont incorporés dans les roches sédimentaires. Ce processus permet de redistribuer les ions calcium et carbonates à une très grande échelle, mais également des éléments traces associés comme le strontium et le barium. Ce phénomène influence ainsi profondément de nombreux cycles biogéochimiques des océans. De plus, il a permis la formation d'une grande partie des continents. Le cycle géochimique du carbonate dépend entièrement du taux de formation des exosquelettes des invertébrés ainsi que du taux de leur dissolution (Whitfield et Watson, 1983). Ainsi, les coccolithes calcitiques se dissolvent plus lentement que les tests des foraminifères calcitiques alors que les aires de surface de leurs coccolithes sont plus grandes que celles des tests des foraminifères. Ce phénomène dépendrait de la microstructure des exosquelettes et de la composition des macromolécules incluses à l'intérieur de leurs cristaux (Honjo et Erez, 1978).

Les récifs coralliens produisent également une grande partie du carbonate de calcium biogénique marin. Contrairement aux exosquelettes planctoniques qui se recyclent dans les océans, les récifs coralliens stockent le carbonate à long terme et en grande quantité. Par ailleurs, 50% du carbonate de calcium entrant dans les océans par les rivières, sont utilisés par ces récifs coralliens (Smith, 1978). Depuis peu, il est envisagé sérieusement d'utiliser ces organismes fixateurs de carbone afin de participer à la lutte contre le réchauffement climatique.

La biominéralisation a également une grande influence sur le cycle biogéochimique marin de la *silice*. Des organismes comme les diatomées, les radiolaires, les silicoflagellés et les éponges siliceuses sont capables de former des exosquelettes silicifiés. Ce mécanisme a

pour conséquence une sous-saturation des océans en silice, alors qu'avant l'apparition de ces organismes, les océans étaient probablement très saturés en silice (Lowenstam et Weiner, 1989). Ces exosquelettes siliceux peuvent se dissoudre dans la colonne d'eau et dans le fond des océans. De plus, ils s'accumulent beaucoup aux endroits de forte productivité primaire à la surface des océans comme particulièrement en Antarctique. En Antarctique, les squelettes siliceux sont formés en surface majoritairement par des diatomées et dans une moindre mesure par des radiolaires. Ils sont ensuite transportés depuis les eaux de surface, jusqu'aux océans profonds. Pendant ce processus, beaucoup d'éléments traces sont redistribués comme le germanium, le zinc, et quelques fois le sélénium, le chrome, le béryllium, le cuivre, et le nickel (Broecker, 1974 ; Whitfield et Watson, 1983).

A une échelle plus petite, d'autres organismes forment des minéraux biogéniques dans les océans qui en sont absents naturellement, influençant ainsi leur environnement. Par exemple, des bactéries magnétotactiques et quelques invertébrés synthétisent de la magnétite, des crevettes mysides et des gastéropodes minéralisent de la fluorite (Lowenstam, 1981), et des acanthaires planctoniques produisent des squelettes de célestite (sulfate de strontium). Chez ces derniers, les squelettes se dissolvent juste après la mort des organismes n'entraînant qu'un effet à court terme sur le cycle chimique du strontium et aucun effet sur celui du sulfate (Whitfield et Watson, 1983).

En résumé, les produits de la biominéralisation ont un impact majeur sur la chimie de l'eau de mer, les sédiments, et les roches sédimentaires, mais aussi sur les environnements d'eau douce et continentaux.

1. 3. Les origines de la biominéralisation

La Terre est apparue il y a 4,5 milliards d'années (M. A.), suivie de la vie, il y a 3,5 milliards d'années. L'évolution du vivant, et notamment de la biominéralisation, a pu être suivie grâce à la formation des fossiles, d'autant plus que les pièces dures fossilisent mieux que les tissus mous. Cependant, les minéraux amorphes fossilisent moins bien que les minéraux cristallins (Lowenstam et Weiner, 1989). Les roches sédimentaires sont principalement constituées d'exosquelettes planctoniques (Simkiss et Wilbur, 1989).

1. 3. 1. Le Précambrien

Le fossile le plus ancien date de 3,465 milliard d'années. C'est un stromatolithe du sud de Marble Bar, dans l'ouest-australien. Ce type de fossile a également été retrouvé sur tous les

Chapitre 1

continents et dans les sédiments de tous âges. Un stromatolithe est une roche marine composée de couches successives de calcaire biogénique et de couches organiques avec une structure dite « laminée double-couche ». Ces stromatolithes sont les fossiles les plus fréquents dans les sédiments d'âge Précambrien (figure 1).

Les premiers stromatolithes fossilisés sont le résultat des premières formes de vie en colonie fixée des cyanobactéries. Leur structure est dite « laminée », car elle est formée de feuillets minéraux biogéniques foncés et superposés de 0,1 à 5 mm d'épaisseur. C'est le biofilm connu le plus ancien. Elle est dite aussi « double-couche » car, dans la plupart des stromatolithes, chaque feuillet est constitué d'une couche de bactéries (foncée), et d'une couche sédimentaire (claire). La cristallisation est induite par les bactéries dans une eau presque saturée en sels minéraux. Selon les cas, l'intérieur du stromatolithe peut être presque plein ou laisser une quantité significative de vides dans lesquels d'autres bactéries ou organismes trouvent abri (Riding, 2000).



Figure 1 : Coupe d'une roche à travers des stromatolithes fossiles et des sédiments intermédiaires datant du protérozoïque (www.wikipedia.org)

Lors de leur croissance, les cyanobactéries forment un ensemble de filaments bactériens appelé « matrice mucilagineuse procaryotique ». Ce mucilage est ensuite capable de piéger certaines des particules en suspension disponibles dans l'eau afin de former une croûte riche en bicarbonates solubles et en carbonates de calcium insolubles qui durcissent. Certaines bactéries peuvent également précipiter le calcium à l'intérieur de la cellule, en cristaux insolubles de carbonate de calcium qui perdureront après la mort de la bactérie. Cette *substance gélatineuse* aurait une fonction de protection contre les radiations solaires, en particulier les UV qui sont mortels pour les bactéries et contre l'oxygène qui est un déchet toxique de la respiration des bactéries photosynthétiques (oxydant produisant des radicaux libres). Elle a également une fonction de protection contre l'acide carbonique, le bicarbonate issu du CO₂ dissous dans l'océan primitif, la chaleur et la déshydratation (les stromatolithes ont ainsi contribué à désacidifier l'océan primitif et à permettre une vie plus complexe). La

couche calcifiée jouerait un rôle de support favorable aux colonies de cyanobactéries, leurs permettant de ne pas être emportées par les courants et de rester fixées dans leur zone d'optimum écologique. C'est aussi une protection physique contre les vagues et l'érosion par les particules sableuses et dures en suspension (Riding, 2000).

Ces communautés de cyanobactéries biominéralisantes ont dominé la vie marine entre 3 500 et 550 M. A., pendant le Précambrien. Les stromatolithes ont acquis un maximum de diversité de formes et de structures il y a environ 1,5 milliards d'années. Ces cyanobactéries auraient contribué à créer une atmosphère riche en dioxygène comme actuellement, ainsi que la couche d'ozone qui ont permis le développement d'une vie terrestre et océanique plus complexe (Awramik, 1992 ; McNamara et Awramik, 1992 ; Wray et al., 1996).

1. 3. 2. Le Cambrien

Ensuite, vers la fin du Précambrien et le début du Cambrien, les cyanobactéries formant les stromatolithes ont été en concurrence avec des formes de vie plus complexes, d'où leur déclin (McNamara, 1996). Les communautés qui formaient ces stromatolithes se sont alors cantonnées à des niches écologiques isolées, entre autres les milieux marins peu profonds, plutôt très salés et peu propices aux autres organismes. En effet, il y a 544 M. A. s'est déroulée l'explosion Cambrienne. Cet évènement est marqué par l'apparition d'une grande quantité de squelettes et de carapaces minéralisés, dans les roches sédimentaires. Cette apparition serait la preuve de l'émergence de grands phylums comme les cnidaires, les brachiopodes, les mollusques, les arthropodes et des vertébrés. En quelques millions d'années, ils ont acquis la capacité de former des tissus minéralisés complexes et fonctionnels. Les fonctions dans lesquelles ces tissus sont impliqués sont très variées et très importantes (cf. 1.1.). L'apparition de ces squelettes minéralisés a apporté de nombreux avantages sélectifs à ces phylums qui sont encore présents aujourd'hui, et qui synthétisent les mêmes formes minéralisées (Lowenstam et Weiner, 1989).

Cependant, l'émergence de ces différents grands groupes de métazoaires actuels daterait de 1000 M. A. à 700 M. A., soit bien avant l'observation des premières traces de minéralisation chez ces organismes. En effet des mollusques sans coquilles datant du Précambrien ont été retrouvés dans la faune d'Ediacaran (Wray *et al.*, 1996 ; Fedonkin et Waggoner, 1997 ; Ayala *et al.*, 1998).

Dans tout le monde du vivant, au moins 60 types de minéraux sont synthétisés à travers 50 phylums différents et ont de nombreuses fonctions différentes (tableau 1). En opposition, les macromolécules acides : glycoprotéines et protéoglycannes, associées aux carbonates et aux phosphates, montrent de fortes similitudes au niveau protéique et fonctionnel et une large distribution (tableau 2). Deux hypothèses sont discutées, soit les différents processus de biominéralisation ont un ancêtre commun et ont divergés ensuite, soit, les similitudes entre ces différents processus sont le résultat d'une convergence évolutive produite dans des taxons différents (Lowenstam et Weiner, 1989 ; Marin *et al.*, 2008).

Un scénario qui permettrait de concilier ces 2 hypothèses a été proposé par Marin et ses collaborateurs pour les organismes métazoaires biominéralisant le calcium (carbonate et phosphate de calcium) (Marin *et al.*, 2003 ; Marin *et al.*, 2008).

Le calcium est un élément essentiel à la vie de tous les organismes eucaryotes depuis leurs origines. En effet, cet ion a de nombreuses fonctions comme métabolite secondaire intracellulaire, dans la contraction musculaire ainsi que dans la sécrétion cellulaire. Il a également des fonctions physiologiques, comme la régulation osmotique et la transmission nerveuse (cf. 1. 4. 1.). Cet ion est stocké dans différents compartiments cellulaires (Pozzan *et al.*, 1994). La machinerie cellulaire nécessaire à la gestion du calcium intracellulaire était donc mise en place bien avant le commencement de la biominéralisation du calcium (sous forme de carbonates ou de phosphates) par les organismes (Lowenstam et Margulis, 1980). Par ailleurs, un changement des conditions physicochimiques des océans du Cambrien aurait favorisé la modification de cette machinerie cellulaire afin de biominéraliser. Ces conditions ne sont pas connues : il pourrait s'agir de la pression d'O₂, de la concentration en ions des océans ou de l'apparition de la prédation (Marin *et al.*, 1996 ; Marin *et al.*, 2000). Il pourrait également s'agir d'une pression interne liée aux gènes. Il existe de grandes similitudes entre les séquences moléculaires des différents gènes de la famille Hox au sein des différents phylums bilatériens (De Rosa *et al.*, 1999 ; Balavoine *et al.*, 2002).

Cette fonction de biominéralisation est bénéfique pour l'organisme. Elle aurait pour origine une fonction de type anti-calcification. En effet, les océans ont été très saturés en carbonate de calcium. La mise en place de mécanismes moléculaires de contrôle de la sursaturation ionique et de la précipitation localisée aurait favorisé l'apparition de squelettes protecteurs de carbonate de calcium et de phosphate de calcium. Certains organismes auraient

donc pu tirer parti de la formation des minéraux biogéniques qui était pathologique (cf. 1. 5. 1.) (Marin *et al.*, 1996 ; Marin *et al.*, 2000).

1. 4. Les différentes composantes des tissus minéralisés

Les tissus minéralisés sont composés principalement de minéraux mais aussi de molécules organiques qui vont permettre la biominéralisation.

1. 4. 1. Les différents types de minéraux

La diversité des types de minéraux produits dans le monde du vivant est très étendue. Le tableau 1 liste les plus importants. En 1989, une soixantaine de minéraux biogéniques avaient déjà été identifiés, notamment grâce au développement des techniques d'identification, mais il reste encore beaucoup de choses à découvrir à leur sujet (Lowenstam et Weiner, 1989).

Différentes méthodes ont été utilisées pour déterminer l'identité des minéraux biogéniques. La technique de la *diffraction des rayons X* a été développée depuis le début des années 1930 et a été beaucoup utilisée à partir de la fin des années 1940. Des échantillons assez grands (mg) et sous forme de poudre sont nécessaires pour être mesurés. De plus, seuls les minéraux cristallins d'une assez grande taille (100 Å) donnent un signal.

La *diffraction des électrons* est également une technique utilisée. Elle requière moins de matériel mais ne permet pas non plus d'identifier la nature des minéraux sous forme amorphe. Les cristaux amorphes sont des cristaux qui ne sont pas ordonnés sur des distances supérieures à 10 ou 15 Å (Mann et al., 1983). De plus, la préparation des échantillons est très délicate et très onéreuse (coupes très fines avec risque de perte de minéraux).

L'*EDS* (Energy Dispersive X-ray Spectrometry) est un outil d'analyse couplé à un MET (Microscope Electronique à Transmission, annexe 1) ou à un MEB (Microscope Electronique à Balayage), qui a beaucoup été utilisé dans le domaine de la biominéralisation. C'est un appareil qui permet d'effectuer l'analyse des éléments chimiques mais qui ne permet pas l'identification des minéraux.

La *spectroscopie Infra-Rouge* est actuellement la technique la plus efficace pour étudier les minéraux biogéniques. En effet, elle nécessite une très faible quantité de tissus (μg). De plus, elle donne des informations sur l'identité des minéraux amorphes et cristallins, y compris lorsque ceux-ci sont mélangés.

Chapitre 1

Depuis quelques années, la spectrométrie Raman est couramment utilisée pour identifier la nature des minéraux (annexe 1).

L'utilisation de toutes ces techniques expérimentales du domaine physique ont permis de démontrer que 80% des types de minéraux biogéniques sont cristallins et 20% sont amorphes. Comme il n'existait que la diffraction des rayons X pour étudier les minéraux pendant des dizaines d'années, il se peut que quelques cristaux amorphes n'aient pas encore été détectés (Lowenstam et Weiner, 1989).

Par ailleurs, environ 50% des minéraux biogéniques contiennent du calcium. Les organismes ont acquis des moyens qui leur permettent de manipuler ce cation très tôt au cours de l'évolution du vivant (cf. 1. 3. 2.). C'est sans doute la raison pour laquelle le calcium a un statut privilégié dans la biominéralisation au même titre que dans les autres processus biologiques. Le terme « calcification » vient du terme « calcium », dû à l'importance de ces ions dans la biominéralisation. Par ailleurs, le deuxième cation et premier ion métallique le plus utilisé est le fer : 35% des types de minéraux. Enfin, les anions les plus fréquents sont les carbonates, les phosphates puis les oxydes (Lowenstam et Weiner, 1989 ; Simkiss et Wilbur, 1989).

Par ailleurs, 60% des types de minéraux biogéniques contiennent des groupements hydroxyles ou/et des liaisons avec des molécules d'eau. Au cours de l'évolution, les organismes ont acquis la capacité de former des phases minérales relativement solubles afin de pouvoir redissoudre leurs pièces minéralisées quand ils manquent d'apports en énergie (cf. 2. 4. 6.) (Lowenstam et Weiner, 1989).

Les phosphates constituent 25% des minéraux biogéniques, notamment avec l'apatite et l'hydroxyapatite. Les apatites forment une famille de phosphates hexagonaux de composition assez variable $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{Cl}, \text{F})$. Par ailleurs, la structure du cristal apatite est de telle sorte que différents ions additionnels comme l'ion fluorure, le carbonate, et le magnésium, s'incorporent en plus des ions calcium et phosphates (Neuman et Neuman, 1953). Ces cristaux sont très petits. Les hydroxyapatites font partie de la classe des apatites et ont des groupements hydroxyles (OH). La composition de ces cristaux n'est pas non plus strictement constituée de calcium et de phosphates. Par exemple, certaines hydroxyapatites sont de la dahlite (apatite de carbonate) ou de la francolite (fluorite de carbonate) (McConnell, 1969).

Chapitre 1

Douze types de minéraux biogéniques organiques ont également été identifiés. Ce sont par exemple des citrates ou des oxalates. Les minéraux organiques ont des fonctions analogues aux minéraux inorganiques. Les termes « minéral » et « organique » ne sont donc pas antagonistes (Lowenstam et Weiner, 1989).

Par ailleurs, les organismes vivants capables de biominéraliser appartiennent à 55 phylums : 37 animaux, 24 procaryotes, 11 plantes vasculaires, 10 protistes (eucaryotes unicellulaires et algues) et 10 champignons. 26 de ces phylums produisent des minéraux biogéniques carbonatés dont 23 sont phosphatés, 21 sont siliceux et 17 sont des oxydes de fer. Ainsi, les minéraux carbonatés, sont les minéraux biogéniques les plus courants en termes de quantité formée et de distribution taxonomique. Ensuite, au niveau taxonomique, les phosphates, les silices et les oxydes de fer sont les plus utilisés. En termes de quantité formée, les carbonates sont suivis par la silice, les phosphates et les oxydes de fer. Le principal oxyde de fer biogénique produit est la magnétite. Enfin, les oxalates et les sulfates métalliques sont également fréquemment utilisés (Tableau 1) (Lowenstam et Weiner, 1989 ; Simkiss et Wilbur, 1989).

La plupart des minéraux biogéniques ne peuvent pas être synthétisés naturellement. En effet, les organismes vivants influencent la précipitation des minéraux dans l'environnement (cf. 1. 5. 1.). Dans le cas contraire, les minéraux biogéniques ont une morphologie différente de celle rencontrée dans le milieu naturel (Lowenstam et Weiner, 1989).

Un même minéral (une même formule chimique) peut cristalliser sous plusieurs structures différentes nommées polymorphes. Par exemple le carbonate de calcium a plusieurs polymorphes comme la calcite, l'aragonite et la vatérite (cf. 2. 4. 4. 4.) (Lowenstam et Weiner, 1989).

Tableau 1 : Types et fonctions des principaux minéraux inorganiques trouvés dans les systèmes biologiques, ^a une partie du calcium est substituée par du magnésium, ^b d'après (Eanes, 2003), ? : données inconnues ou non confirmées (Mann, 1988 ; Simkiss et Wilbur, 1989 ; Eanes, 2003)

<i>Minéraux</i>	<i>Formules</i>	<i>Organismes/ Fonctions</i>
Carbonates de calcium		
Calcite	CaCO_3^a	Algues/ coccolithes Mollusques / exosquelette
Aragonite	CaCO_3	Trilobites/ lentilles des yeux Poissons/ otolithe (équilibre)
Vatérite	CaCO_3	Mollusques / Exosquelette
Amorphe	$\text{CaCO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Ascidies/ spicules Plantes/ stockage de calcium
Phosphates de calcium		
Hydroxyapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Vertébrés/ endosquelette, dent, stockage de calcium
Phosphate d'octacalcium	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	Vertébrés/ précurseur osseux ?
Amorphe	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2^b$	Mollusques bivalves / Stockage du calcium Vertébrés/ précurseur osseux ?
Oxalates de calcium		
Whewellite	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Plantes/ stockage de calcium
Weddellite	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Plantes/ stockage de calcium
Groupe II A des sulfates métalliques		
Gypse	CaSO_4	Larves de méduses/ capteur de gravité
Barite	BaSO_4	Algues/ capteur de gravité
Celestite	SrSO_4	Acanthaires/ support cellulaire
Dioxydes de silicone		
Silice (opale)	$\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Algues/ exosquelette
Oxydes de fer		
Magnétite	Fe_3O_4	Bactéries/ magnétotactisme Mollusques polyplacophores (Chitons) / dents
Goethite	$\alpha\text{-FeOOH}$	Mollusques gastéropodes (Patelles) / dents
Lépidocrocite	$\gamma\text{-FeOOH}$	Mollusques polyplacophores (Chitons) / dents
Ferrihydrite	$5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Animaux et plantes/ protéines stockant du fer

Pour conclure, l'identité des minéraux est très variée dans le monde du vivant. De plus, ces minéraux sont présents dans des structures très variées. Il est donc assez difficile de comprendre tous leurs processus de formation.

1. 4. 2. Les macromolécules organiques

Les macromolécules organiques jouent des rôles importants dans les processus de biominéralisation. Ces macromolécules ne sont pas associées à tous les types de minéraux biogéniques mais sont surtout présentes dans les cas de biominéralisation contrôlée. Elles ont des fonctions très variées notamment dans le contrôle de la formation des tissus calcifiés (cf. 1. 5. 2.). Par ailleurs, ces macromolécules ont principalement été étudiées dans des tissus minéralisés associés aux carbonates ou aux phosphates, et surtout dans les os et dans les dents de mammifères (Tracy et al., 1987). Celles des mollusques (Marin et al., 2008) et des spicules ou des piquants des oursins (Killian et Wilt, 1996) sont également partiellement connues.

Afin d'extraire et d'étudier les macromolécules, il est nécessaire d'enlever la phase minérale. Une des techniques les plus fréquentes pour dissoudre les minéraux de carbonates et de phosphates de calcium est d'utiliser l'agent chélateur du calcium EDTA (Acide Ethylène Diamine Tetracétique, acide neutralisé) qui a un pH assez neutre. Cependant l'EDTA doit être enlevé ensuite avec beaucoup de précautions, ce qui est parfois difficile (Worms et Weiner, 1986).

Comme l'EDTA ne dissout que les carbonates et les phosphates de calcium, les autres minéraux biogéniques comme la silice (opale) ou les oxydes ne peuvent être dissous que dans d'autres acides (Lowenstam et Weiner, 1989). Quand la dissolution des minéraux dans l'acide se fait selon des paramètres précis, les macromolécules ne sont pas dégradées. Par exemple, il faut 0.1M d'acide formique pour extraire les glycoprotéines acides de la dentine (Butler et al., 1981). De plus, l'acide fluorique froid permet de dissoudre les squelettes en silice, comme ceux des radiolaires, sans hydrolyser les constituants protéiques. Enfin, comme l'EDTA n'est pas toujours facile à enlever, l'acide acétique est également fréquemment utilisé pour dissoudre les carbonates de calcium des coquilles de mollusques (Marin et al., 2008).

Après la dissolution des minéraux dans l'EDTA ou dans d'autres acides, deux phases, une soluble et une insoluble, sont obtenues. Ces phases contiennent très souvent des macromolécules. La distinction entre ces deux classes de macromolécules est empirique vu qu'elle dépend de leur solubilité premièrement dans les acides puis, quand les acides sont

Chapitre 1

enlevés, dans l'eau (Lowenstam et Weiner, 1989). Les macromolécules solubles acides seront présentées dans un premier temps, suivies des macromolécules insolubles ou dites de « la trame organique ».

Chapitre 1

Tableau 2 : Classes majeures de macromolécules identifiées dans les principales pièces minéralisées formées par des processus de minéralisation contrôlée (cf. 1. 5. 2). Ce tableau liste les macromolécules insolubles « de la trame », ainsi que celles qui sont solubles et acides. Il est noté « Absentes ? » quand les macromolécules ne sont pas détectées. Elles peuvent être absentes ou sous le seuil de détection. Les lipides, non répertoriés dans ce tableau, sont également présents dans les matrices organiques liées aux minéraux (Lowenstam et Weiner, 1989)

Phylum	Macromolécules acides majeures	Macromolécules majeures de la « trame »	Parties dures du squelette
Chordés			
Craniata	Glycoprotéines, protéoglycane, protéines contenant des acides glutamiques Glycoprotéines	Collagène type 1 Collagène	Os et dentine (dahllite) Email dentaire (francolite, dahllite)
	Glycoprotéines	Amelogenine ?	Email dentaire (dahllite)
	Glycoprotéines, protéoglycane	Absentes ?	Cartilage (dahllite)
Echinodermes			
Echinoidea	Glycoprotéines, protéoglycane	Absentes ?	Test du squelette, épines, spicules (calcite)
Mollusques	Glycoprotéines, protéoglycane ?	Complexe protéique et β -chitines fibrillaires Absentes dans certains	Coquille (calcite, aragonite)
Arthropodes	Glycoprotéines ?	Complexe protéique et β -chitine	Cuticule (calcite)
	Glycoprotéines	Absentes ?	Granules (ACP)
Cnidaires	Glycoprotéines	Absentes ?, protéines ou complexe de chitine dans certains cas	Squelette, spicules (calcite, aragonite)
Annélides			
Serpulida	Glycoprotéines	Complexe protéique et α chitine	Tubes (calcite, aragonite)
Brachiopodes			
Inarticulata	Protéines	Complexe protéique et chitine	Coquille (francolite)
Articulata	Pas de données	Protéines riches en glycines	Coquille (calcite)
Ectoproctes	Présentes mais peu définies	Complexe protéique et chitine	Cuticule (Calcite)
Poriféraires	Pas de données	Protéines filamenteuses	Spicules (opale)
Radiolaires	Glyco(?)protéines	Pas de données	Squelette (opale)
Foraminifères	Glycoprotéines, protéoglycane ?	Pas de données	Coquille (calcite)
Coccolithophoridés	Polysaccharides acides et protéines ?	Absentes ?	Coccolithes (calcite)

1. 4. 2. 1. Les protéines acides - solubles

Des macromolécules solubles sont très souvent identifiées dans les minéraux. Elles sont très acides. Ce sont des protéines riches en acides aspartiques, glutamiques et qui contiennent des résidus de sérines et de thréonines phosphorylées. Elles sont souvent associées par des liaisons covalentes à des polysaccharides acides contenant des groupements carboxylates ou sulfatés (Lowenstam et Weiner, 1989). Ces protéines sont composées de glycoprotéines et de protéoglycanes acides (tableau 2). Elles ont été retrouvées dans presque tous les tissus minéralisés étudiés, sauf par exemple chez *Halimeda sp.*, une algue rouge calcaire qui produit des cristaux d'aragonite sous des conditions peu contrôlées (Wilbur *et al.*, 1969 ; Nakahara et Bevelander, 1978 ; Borowitzka, 1982 ; Weiner, 1986).

Ces protéines acides ont plusieurs grandes fonctions. Elles sont notamment impliquées dans la régulation de la formation des minéraux car elles sont fortement chargées. Ces protéines acides sont localisées au cœur du biominéral. Cependant, l'origine de ces molécules et leur évolution ne sont pas connues. Elles peuvent soit avoir leur origine dans un ancêtre commun puis avoir ensuite acquis des propriétés structurales variées, soit avoir pour origine différentes sources qui auraient ensuite convergées. Enfin, ces protéines acides peuvent avoir des propriétés antagonistes, comme la nucléation et l'inhibition de la formation des cristaux de la coquille de *Mercenaria mercenaria* (Crenshaw, 1972b).

La conformation secondaire de ces protéines acides a été étudiée. Dans les coquilles de mollusques (Worms et Weiner, 1986), les spicules des échinodermes (Berman *et al.*, 1988), l'émail des dents (Little, 1959 ; Jodaikin *et al.*, 1986) et les os (Renugopalakrishnan *et al.*, 1986), elles adoptent partiellement une conformation en feuillet- β *in vitro*, avec la présence de calcium (cf. 2. 4. 4. 3.).

1. 4. 2. 2. Les macromolécules insolubles ou dites « de la trame »

Après déminéralisation, une fraction insoluble contenant une matrice organique très variée est très souvent observée. Celle-ci dépend du type de minéral. Cependant, les macromolécules insolubles ont des points communs : elles sont fortement liées entre elles, relativement hydrophobes et forment une trame, un moule, dans lequel le minéral se forme. En particulier, elles sont bien différentes des molécules acides. Ces molécules de la trame sont présentes en grandes quantités dans de nombreux tissus minéralisés, mais sont parfois absentes ou en dessous du seuil de détection (tableau 2) (Lowenstam et Weiner, 1989).

Ces macromolécules joueraient un rôle de substrat pour les molécules acides, comme par exemple chez celles issues de coquilles de mollusques. Ceci a été mis en évidence lors d'expérimentations *in vitro* (Greenfield *et al.*, 1984 ; Addadi et Weiner, 1985).

Par ailleurs, comme ces macromolécules de la trame sont très variées et parfois absentes ou en très faible quantité, leurs fonctions ne sont peut être pas indispensables à la biominéralisation. Elles permettraient de contrôler les propriétés mécaniques du minéral formé. Les mollusques *Tridacna sp.* (un bivalve) et *Strombus sp.* (un gastéropode), sont les seuls mollusques étudiés à ne pas avoir de macromolécules insolubles dans leur coquille, alors que celles-ci sont grandes et robustes et qu'ils sont taxonomiquement différents (Weiner *et al.*, 1983b). En opposition, toutes les autres coquilles de mollusques examinées, contiennent de grandes quantités de molécules de la trame. Par exemple, le *Nautilus sp.*, qui a une coquille très fine et qui subit de hautes pressions hydrostatiques, a la plus grande proportion de macromolécules insolubles connue chez les coquilles de mollusques. Ce céphalopode a une coquille divisée en chambres dont la pression des gaz varie quand l'animal descend dans les profondeurs des océans (Hare et Abelson, 1965).

En conclusion, les macromolécules associées aux différents biominéraux sont très variées. Elles jouent des rôles importants dans la biominéralisation comme dans son contrôle, la capture du calcium, ou dans la structuration du minéral.

1. 5. *Les processus généraux de la biominéralisation*

Le contrôle de la biominéralisation est très varié. Il forme un spectre large et continu : entre aucun contrôle apparent et un contrôle de chaque détail. Il est donc assez difficile de diviser les processus de minéralisation en deux groupes opposés : l'un contrôlé et l'autre pas. Cependant pour plus de lisibilité, la biominéralisation induite et la biominéralisation contrôlée seront décrites dans des paragraphes séparés.

Les différents contrôles existants fonctionnent à différentes échelles. Cela peut être au niveau cellulaire comme au niveau moléculaire. De plus, parfois différentes combinaisons de contrôles permettent d'aboutir à la même structure minérale (Lowenstam et Weiner, 1989).

1. 5. 1. La minéralisation biologiquement induite ou non contrôlée

La formation de minéraux d'une façon passive par des organismes est très courante dans les environnements aquatiques. L'organisme change l'environnement qui l'entoure même très modestement. Par exemple, dans le cadre du métabolisme normal de l'organisme,

la cellule excrète des ions et des déchets du métabolisme qui précipitent avec d'autres ions dans le milieu extracellulaire. Une telle précipitation se produit également lors de la construction de surfaces chargées comme la paroi cellulaire. Le plus souvent, les organismes ne tirent aucun avantage de cette précipitation et elle n'a aucun coût métabolique supplémentaire pour lui. Celle-ci peut même être pathologique, comme lors de la formation de calculs rénaux chez les vertébrés (Lowenstam et Weiner, 1989).

Une minéralisation biologiquement induite se déroule dans un environnement ouvert, et non dans un espace délimité, et sans cellule ou macromolécule spécialisée. Si les minéraux obtenus sont cristallins, ils sont assez similaires à leurs homologues inorganiques (formés sans organisme vivant). Ils sont souvent de tailles variées et agrégés au hasard. Par ailleurs, les caractéristiques des minéraux induits par un organisme dépendent plus de son environnement que de ses caractéristiques biologiques propres. Un même organisme forme des minéraux différents dans chaque environnement (Lowenstam et Weiner, 1989).

Ce processus de minéralisation biologiquement induite est dominant chez les procaryotes et les champignons, et relativement fréquent chez les protoctistes (eucaryotes unicellulaires et algues). Il est également fréquent chez les invertébrés, comme par exemple les mollusques mais aussi chez les vertébrés. Par exemple, la formation des cristaux de calcite est induite dans le squelette axial des gorgones de la famille des Pennatulidae (Ledger et Franc, 1978). Chez les mollusques, la formation de cristaux de weddlite et de brushite, dans le bec des *Nautilus sp.* est également induite entre des dépôts de calcite dont la formation est contrôlée (Lowenstam et al., 1984). Chez les mollusques, des minéralisations induites et contrôlées peuvent ainsi être présentes chez un même individu.

En conclusion, la biominéralisation induite est un processus très courant dans le monde du vivant même si elle n'est pas toujours bénéfique pour les organismes.

1. 5. 2. La Minéralisation Biologiquement Contrôlée (MBC)

Le processus de MBC est différent de la minéralisation induite. Il est présent chez de nombreux organismes. Les types de minéraux biogéniques formés par ce processus ne sont pas présents dans le milieu naturel (Lowenstam et Weiner, 1989). Dans le monde du vivant, les structures minéralisées peuvent être très complexes et très régulières, comme les coquilles, les os ou les dents. Ceci est possible grâce aux différents processus de contrôle qui agissent de concert sur la biominéralisation (Simkiss et Wilbur, 1989). Lors d'une MBC, les organismes,

Chapitre 1

qui minéralisent, mettent en œuvre une machinerie physiologique, tissulaire et moléculaire spécifique. Ces processus dynamiques, spécifiques et complexes sont contrôlés par l'expression génétique et entraînent un coût énergétique pour l'organisme. En contrepartie, ces organismes profitent de la formation du minéral produit. Les différents processus de contrôle de la biominéralisation sont assez limités. Ils sont la délimitation d'un espace, la formation d'une trame : une matrice organique préformée, l'établissement d'une solution saturée, le contrôle de la nucléation, le contrôle de la croissance cristalline et la cessation de la croissance cristalline (Lowenstam et Weiner, 1989).

Les processus de biominéralisation présents chez les mollusques vont maintenant être particulièrement détaillés. Cette base servira par la suite à bien comprendre les altérations de ces processus lors de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise. La grande majorité des processus de minéralisation de ce groupe des mollusques est contrôlée au niveau de 6 points de contrôles : la délimitation d'un espace, la formation d'une trame, l'établissement d'une solution saturée, le contrôle de la nucléation, le contrôle de la croissance cristalline et la cessation de la croissance cristalline. Ces différentes étapes seront décrites sous forme d'encarts verts lors de la présentation de la biominéralisations chez les mollusques.

2. La biominéralisation chez les mollusques

2. 1. *Introduction à la biominéralisation des mollusques*

Les mollusques sont des organismes connus pour leur capacité à minéraliser. Ils sont notamment connus pour la formation de leurs coquilles solides, qui protègent avec succès leurs corps mous depuis 540 M. A.. Cette formation est juste un exemple parmi beaucoup d'autres de minéralisation chez les mollusques (tableau 3, figure 2). En effet, ces animaux produisent 21 minéraux biogéniques différents qui possèdent environ 17 fonctions différentes. Ces minéraux peuvent être amorphes (fluorite, carbonate de calcium, phosphate de calcium, pyrophosphate de calcium et silice amorphes), même si ils sont majoritairement cristallins. Les minéraux cristallins peuvent être des minéraux peu communs comme la weddellite, le fluorite de calcium, la barite, la magnétite, le lepidocrocite et la goethite (Lowenstam et Weiner, 1989). La weddellite est un minéral d'oxalate de calcium qui est souvent formé lors de pathologies chez les animaux. La weddellite a également été retrouvée dans une des 2 couches des plaques minéralisées du gésier d'un gastéropode des grands fonds : *Scaphander cylindrellus*. La weddellite est très dure, c'est pourquoi la couche qu'elle constitue permet de broyer les proies qui contiennent des coquilles (calcite et aragonite). Ces plaques sont également composées d'une couche de carbonate de calcium amorphe. C'est le premier cas décrit de weddellite non pathogène chez des animaux (Lowenstam, 1968). La coquille de *Nautilus sp.* est formée de 5 minéraux différents. Par ailleurs, la dent des chitons est composée de 3 minéraux définitifs différents, eux-mêmes formés à partir de 2 autres minéraux de transition (cf. 2. 3. 4.) (Lowenstam et Weiner, 1989).

En plus des coquilles, il existe de nombreuses structures minéralisées chez les mollusques comme les coquilles d'œufs calcifiées des gastéropodes terrestres, les organes de reproduction calcifiés de certains gastéropodes ('love darts'), la radula des chitons et de certains gastéropodes brouteurs, les granules intracellulaires de phosphate de calcium amorphe dans les branchies des Unionidae, le ligament de la charnière des coquilles et les bouées (des poches d'air pour la flottabilité) (tableau 3, figure 2). Ces organes minéralisés sont impliqués dans des fonctions très variées comme la protection mécanique des tissus mous, la reproduction, la nutrition, la flottabilité, l'orientation, la détoxification et le stockage des ions. La majorité de ces structures minéralisées est formée à l'extérieur des cellules.

Chapitre 1

Cependant, quelques unes de ces structures sont formées dans des cellules comme les granules ou les spicules (Lowenstam et Weiner, 1989 ; Simkiss et Wilbur, 1989).

Tableau 3 : Principales structures minéralisées des mollusques (Simkiss et Wilbur, 1989)

Coquilles
Epiphragmes (structures temporaires des gastéropodes pulmonés contre la dessiccation)
Ligaments de la charnière
Radulas, dents
Resiliums (maintient de la coquille ouverte)
Barres calcifiées des branchies
Coquilles d'œufs
Capsules contenant les œufs
Parois des spermatophores
Renforts de terriers
Crochets, plaques, stylets, tiges, palettes de pénis
Complexe du byssus
Lentilles des yeux
Spicules
Statolithes
Dards
Plaques, becs de gésiers
Artères calcifiées
Dépôts rénaux
Granules intracellulaires
Granules de phosphate extracellulaires de branchies et de la surface coquillière interne

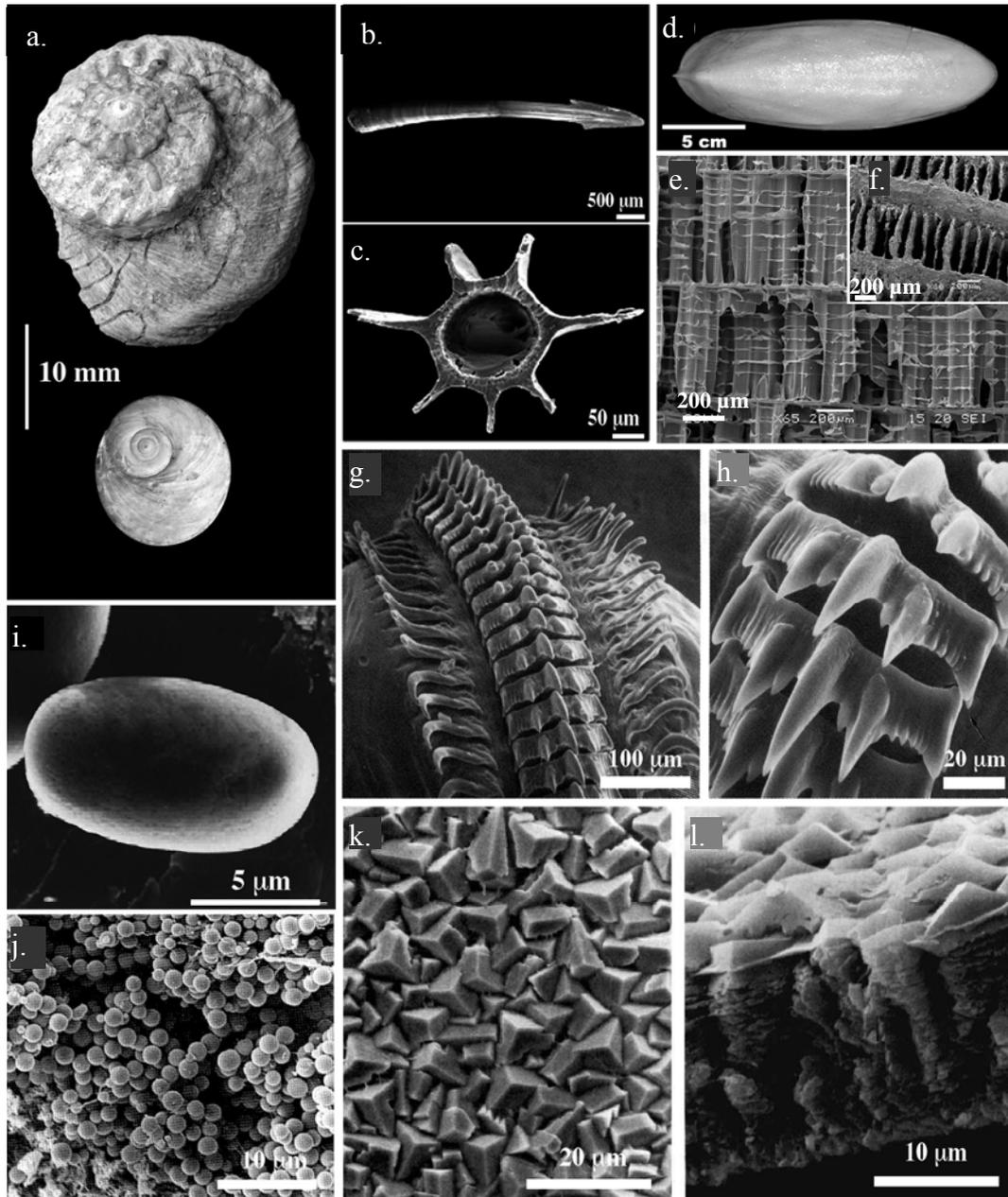


Figure 2 : Diversité de structures et de fonctions des biominéralisations chez les mollusques a : Coquilles calcifiées d'un gastéropode marin (Marie, 2008), b et c : Observations au MEB d'un organe de reproduction calcifié ('love dart'), le pénis d'un escargot terrestre *Monachoides vicinus*, c : coupe transversale (Koene et Schulenburg, 2005), d, e et f : Observations macroscopiques et microscopiques au MEB d'un os de seiche ; bien que majoritairement composé de chitine, cet organe est partiellement calcifié, e, f : détails (Seibel et al., 2004), g-h : Observations au MEB d'une radula de magnétite du chiton *Urosalpinx cinerea follyensis* (Simkiss et Wilbur, 1989), i : Observation au MEB d'une statoconie, granule de carbonate de calcium de l'organe de perception de la gravité du gastéropode *Aplysia californica* (Pedroso et al., 1997), j : Observation au MEB de granules de phosphate de calcium amorphe du manteau d'un bivalve paléohétérodonte *Hyridella depressa* (Byrne, 2000), et k et l : Observations au MEB d'une coquille calcifiée d'œuf de gastéropode terrestre (Tompa, 1974)

A l'intérieur d'un seul phylum, il existe donc une très grande diversité de formes, de tailles, d'organisations, et de sites de minéralisation (figure 2). En comparaison, les échinodermes ont également des minéraux qui remplissent des fonctions variées, mais ils utilisent essentiellement le même type de construction minérale.

Les mollusques ont acquis plusieurs processus de minéralisation au cours de l'évolution, afin de former tous leurs tissus minéralisés (Lowenstam et Weiner, 1989).

Le phylum des mollusques comporte 8 taxons. Tous ces mollusques présentent des structures minéralisées (tableau 3), mais pas toujours des coquilles. Ainsi, les solénogastres et caudofovéates (aplacophores) forment un groupe sans aucune coquille. Par contre, leur corps est entièrement ou partiellement couvert d'une couche dense de spicules ou d'écailles minéralisés. Par ailleurs, les polyplacophores ou chitons couvrent une partie de leur corps avec des plaques qui ont l'aspect de coquilles alors qu'une autre partie est couverte par des spicules minéralisés. Les taxons portant des coquilles sont les céphalopodes, les gastéropodes, les bivalves, les scaphopodes et les monoplacophores (Lowenstam et Weiner, 1989).

Les polyplacophores sont bien connus pour la formation de leurs dents alors que les céphalopodes, bivalves et gastéropodes sont bien connus pour celle de leur coquille.

Dans cette partie sur la biominéralisation chez les mollusques, la phylogénie des mollusques sera d'abord décrite. Ensuite, une partie regroupera la biominéralisation chez les solénogastres, caudofovéates, polyplacophores, monoplacophores et scaphopodes, et dans une autre partie celle des céphalopodes, bivalves et gastéropodes. Dans cette partie, une attention particulière sera portée sur la biominéralisation de la palourde japonaise (encarts violets). Enfin, dans un dernier temps, la réparation coquillière des mollusques sera décrite.

2. 2. *La phylogénie des mollusques*

Depuis 2001, une classification phylogénétique basée sur des résultats obtenus avec l'aide de la biologie moléculaire a été créée. La classification phylogénétique des mollusques et en particuliers des bivalves est représentée dans la figure 3 sous la forme d'un arbre. Un bivalve est un eucaryote, uniconte, opisthoconte, métazoaire, eumétazoaire, bilatérien, protostomien, lophotrochozoaire, eutrochozoaire, spiralien, mollusque, eumollusque, conchifère, ganglioneux, diasome (Lecointre et Le Guyader, 2001).

Chapitre 1

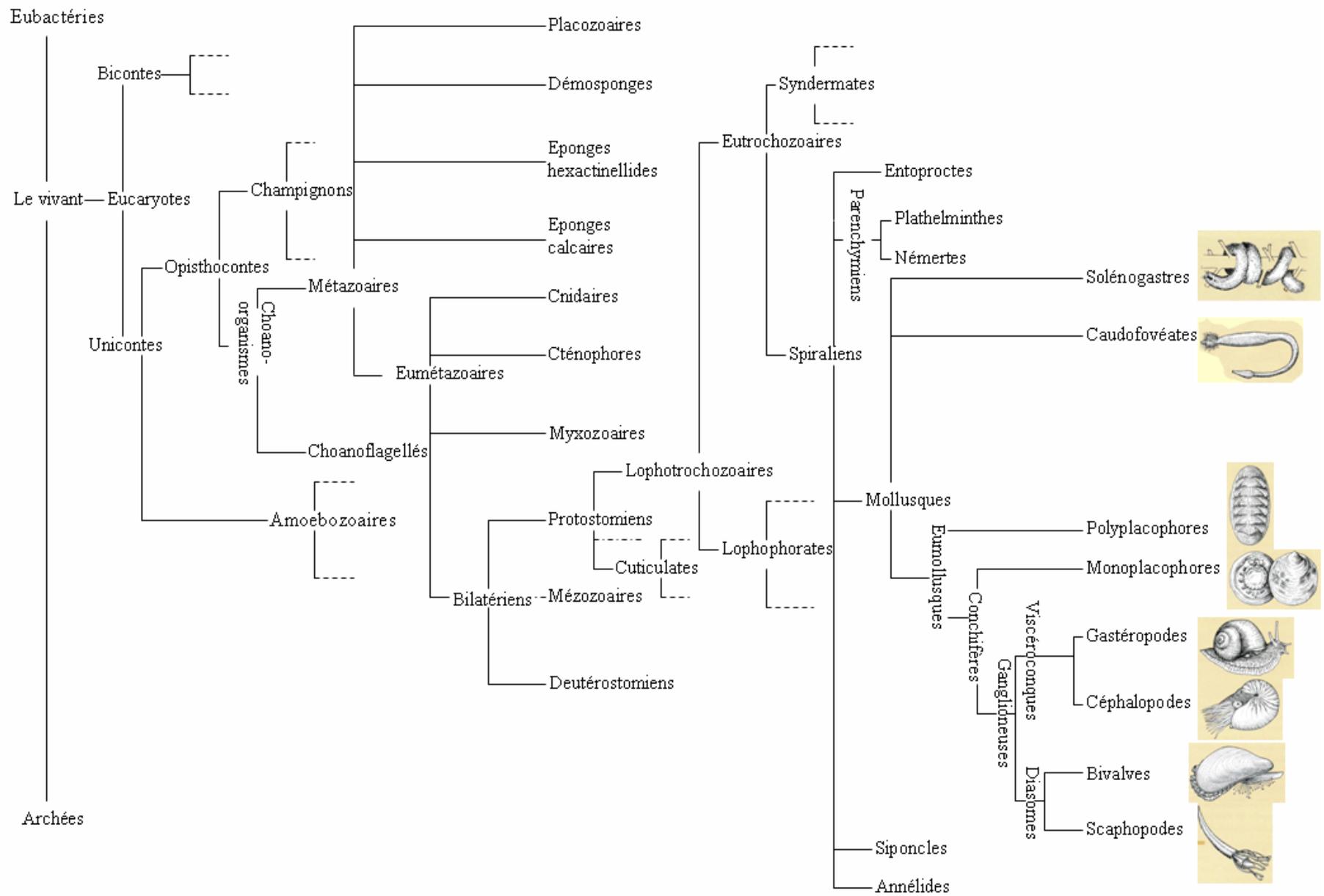


Figure 3 : Arbre phylogénétique des bivalves d'après (Lecointre et Le Guyader, 2001) ; un exemple de solénogastre *Rhopalamenia aglapheniae* (1 à 1,5 cm), de caudofovéate *Ckaederma nitidulum* (6 cm), de polyplacophore : *Lepidopleurus cajetanus* (2,5 cm), de monoplacophore : *Neopilina galathea* (3,5 cm), de gastéropode l'escargot de Bourgogne *Helix pomatia* (10 cm), de céphalopode : le nautilus *Nautilus macromphallus* (jusqu'à 20 cm), de bivalve : la moule *Mytilus edulis* (8 cm) et de scaphopode : le dentale *Dentalium entalis* (4 cm)

2. 3. Les minéralisations chez les solénogastres, caudofovéates, polyplacophores, monoplacophores et scaphopodes

2. 3. 1. Les solénogastres et les caudofovéates (les aplacophores)

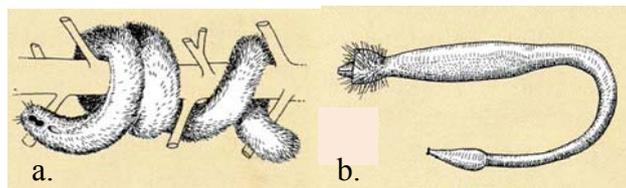


Figure 4 : Exemples d'aplastophores, a. : le solénogastre *Rhopalamenia aglapheniae* (1 à 1,5 cm) et b. : le caudofovéate *Ckaederma nitidulum* (6 cm) (Lecointre et Le Guyader, 2001)

Les aplacophores rassemblent deux groupes phylogénétiques de mollusques : les solénogastres et les caudofovéates. Ces animaux sont sans coquille et ont un corps vermiforme (figure 4). Les seules pièces minéralisées présentes chez ces animaux sont les spicules présents sur la totalité de la surface externe de l'animal ou au moins sur toute la zone dorsale. Ces spicules ont des formes très variés et font quelques dizaines de micromètres de long (Schwabl, 1963). Ils sont généralement formés d'aragonite (Lowenstam et Weiner, 1989) et dans de rares cas de calcite (Schmidt, 1924). Ils présentent aussi une faible part de matrice organique (Von Graff, 1875). Au début du processus de minéralisation, les spicules sont d'abord formés à l'intérieur des cellules. Lorsqu'ils deviennent assez grands, la cellule épithéliale dans laquelle ils grandissent se dilate et devient alors multi-nucléée. Cette cellule pénètre ensuite dans la cuticule qui enveloppe les aplacophores. Cette dernière est recouverte d'une couche épithéliale. Ce processus de minéralisation est original car toute la formation se fait dans une cellule (encart 1) (Woodland, 1907). Soit ces organismes sont des mollusques sans coquille dont l'origine est antérieure à l'apparition de la coquille, soit ils constituent deux

classes de mollusques dérivés, ayant perdu secondairement leur coquille (Brusca et Brusca, 1990).

2. 3. 2. Les polyplacophores

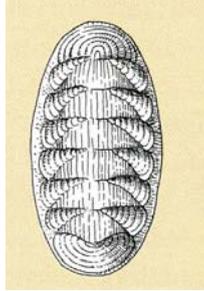


Figure 5 : Exemple de polyplacophore : *Lepidopleurus cajetanus* (2,5 cm) (Lecointre et Le Guyader, 2001)

Les polyplacophores sont souvent appelés « chitons ». Leur coquille est très différente de celle des autres mollusques car elle est composée de 8 plaques d'aragonite (figure 5). Ce recouvrement ne forme donc pas une masse dure et unie. La métamérie de cette coquille se retrouve également dans les tissus mous des chitons comme les muscles, les branchies et le système nerveux (Lowenstam et Weiner, 1989). Une autre caractéristique spécifique des chitons est le développement d'une gaine charnue et épaisse recouvrant l'animal qui est une adaptation du manteau. Chez quelques espèces, cette gaine recouvre même les plaques de la coquille. De plus, elle est fréquemment cuirassée par la présence de spicules aragonitiques, et plus rarement par des écailles aragonitiques (Schmidt, 1924). Les spicules du manteau qui sont en position dorsale, sont fabriqués d'une manière proche de celle des aplacophores. En effet, les premiers stades de minéralisation se font dans une vésicule, à l'intérieur d'une cellule épithéliale (encart 1). Quand la croissance est bien avancée, la taille du spicule dépasse celle de la cellule et il traverse la membrane cellulaire. La croissance continue alors jusqu'à ce que le spicule ait atteint sa taille normale. La cellule épithéliale forme alors une structure en forme de coupe, qui enveloppe la base du spicule (Haas, 1976).

Encart 1 : La délimitation d'un espace chez les mollusques (1)

Les processus de biominéralisation des mollusques sont majoritairement contrôlés. Une des principales caractéristiques de la MBC (Minéralisation Biologiquement Contrôlée), est que la biominéralisation se passe dans un espace clos, entouré par une barrière à travers laquelle les ions (Ca^{2+} , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , Fe^{2+} ...) ne diffusent pas librement (Wilbur, 1984 ; Simkiss, 1986). Cette délimitation de l'espace est un des moyens de contrôler la minéralisation. Il n'existe qu'un nombre limité de façons de délimiter cet espace chez tous les organismes minéralisants (figure 6). La figure 6 présente leurs différentes combinaisons et donne des exemples d'organismes qui les utilisent. Cet espace délimité est une zone adaptée pour la formation de la trame organique.

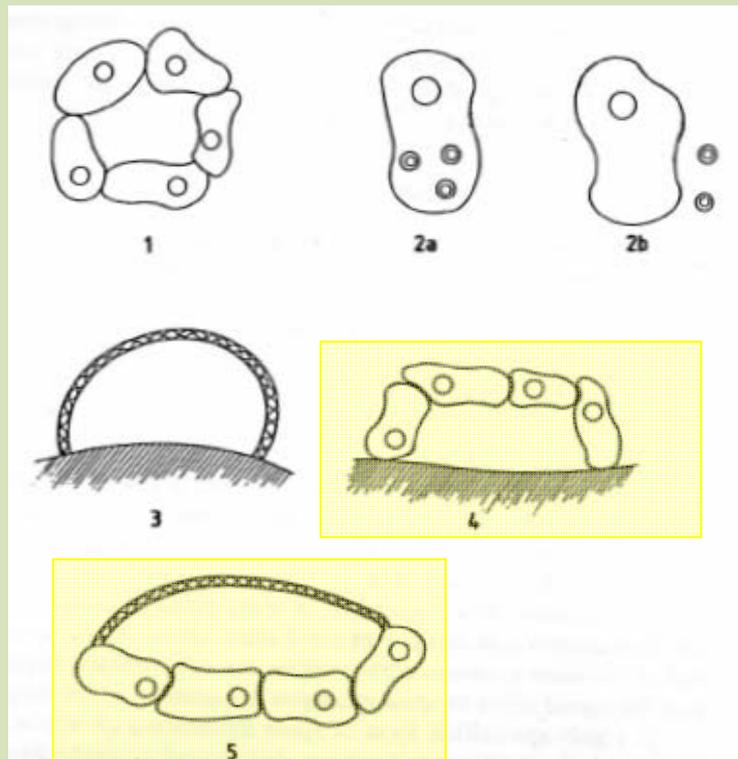


Figure 6 : Illustration schématique des modes communs de délimitation de l'espace lors de la biominéralisation. (1) Espace formé par des cellules avec des jonctions étanches, exemple : les syncytiums (régions de cytoplasme contenant plusieurs noyaux) des échinodermes. (2) Vésicules entourées par une bicouche lipidique localisée (a) à l'intérieur de la cellule, exemples : les granules intracellulaires de stockage de calcium (Brown, 1982) et les spicules calcifiés des solénogastres, caudofovéates et polyplacophores et (b) à l'extérieur de la cellule, exemple : les vésicules de matrice de cartilage. (3) Espace formé par un kyste de macromolécules polymérisées sur un substrat qui peut être une partie déjà formée du squelette, exemple : les foraminifères Rotalines. (4) Espace formé par des cellules et un substrat exemple : les couches coquillières internes des mollusques. (5) Espace formé par des cellules et des macromolécules polymérisées, exemple : les couches coquillières externes des mollusques. Jaune : processus impliqués dans la formation de la coquille des mollusques (Lowenstam et Weiner, 1989)

Un des moyens de délimiter l'espace chez les mollusques est donc l'utilisation des *bicouches lipidiques*, comme les membranes cellulaires ou les vésicules intra et extracellulaires (figure 6.2a) (Lowenstam et Weiner, 1989). C'est particulièrement le cas pour la formation des spicules chez les solénogastres, les caudofovéates (cf. 2. 3. 1.) et les polyplacophores.

Chapitre 1

Malgré quelques différences évidentes, la structure des plaques des polyplacophores ressemble à celle des autres coquilles de mollusques. Chez les polyplacophores, il existe une couche originale entre la couche organique externe de protection, appelée le périostracum, et les couches coquillières internes. Ce *tégument central* est composé de structures sphérulitiques, et abrite des organes sensoriels qui chez quelques espèces sont sensibles à la lumière (Haas, 1976).

La *formation des dents minéralisées* chez les polyplacophores est un mécanisme particulièrement étudié (figure 7). C'est un bon exemple de minéralisation biologiquement contrôlée (encarts 1-3). Certaines espèces de chitons vivant dans des eaux de surface utilisent leurs dents pour racler et enlever la surface des substrats rocheux. C'est le cas des espèces endolitiques (vivant dans la roche) (Lowenstam, 1962b). La plupart des chitons vivent dans des milieux intertidaux et subtidaux. Dans les zones côtières tropicales et calcaires, le raclage entraîne une récession du trait de côte (Lowenstam, 1974). Ce raclage est possible parce que leurs dents latérales majeures sont plus dures que le substrat. Elles sont en effet recouvertes par un minéral d'oxyde de fer dur : la magnétite (Lowenstam, 1962b). C'est la première découverte de magnétite biologiquement formée. Elle a été observée depuis chez un grand nombre d'organismes (tableau 1) (Lowenstam et Kirschvink, 1985).

Les dents des chitons sont organisées en rangées transverses le long de la radula. La radula est une longue structure en forme de langue qui a pour origine l'ectoderme. Chaque rangée comprend une dent centrale et 8 paires de dents d'encadrement. Seule la seconde paire de dents d'encadrement, appelées aussi « dents latérales majeurs » est minéralisée. La figure 7 montre la localisation de la radula dans l'organisme.

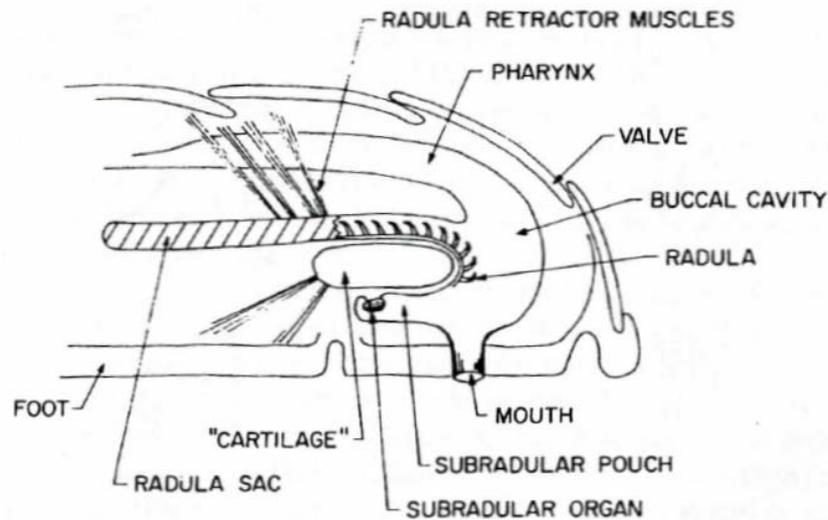


Figure 7 : Diagramme d'une section longitudinale de la partie antérieure d'un chiton montrant la localisation de la radula et l'orientation des dents dans le sac de la radula (Kirschvink et Lowenstam, 1979)

Seule une extrémité de la radula est présente au niveau des parties buccales. De ce fait, seules les dents de la région antérieure sont utilisées pour le raclage. Ceci représente seulement les 8 à 10 dernières rangées chez *Cryptochiton sp.*. Quand ces dents deviennent abrasées ou cassées, elles sont jetées avec un rythme moyen d'une rangée toutes les 12 à 48h en fonction des espèces. Pour maintenir un équilibre, de nouvelles dents sont formées par des cellules odontoblastes à l'autre extrémité de la radula, avec le même rythme. La radula est donc un tapis roulant constitué de rangées de dents. Chaque rangée contient des dents un peu plus avancée que la rangée d'avant. Ainsi, tout le processus de biominéralisation est visible en même temps. C'est pourquoi il a beaucoup été étudié (Nesson, 1968 ; Kirschvink et Lowenstam, 1979).

Les patelles (gastéropodes) ont également des dents qui râpent les minéraux, et qui chez quelques espèces sont même minéralisées (Lowenstam, 1962a, 1971). Cependant, leur structure est assez différente de celle des chitons (Lowenstam, 1962a ; Runham *et al.*, 1969 ; Mann *et al.*, 1986). Il existe également une radula chez les escargots pulmonés (gastéropodes). Par exemple, *Cepaea nemoralis* remplace toutes les dents de sa radula en 30-35 jours et *Lymnaea stagnalis* en 24 jours (Mackenstedt et Märkel, 1987).

Le composé organique majeur de la dent des chitons est la chitine. Elle est probablement associée à un ensemble de protéines. La biochimie de ces dents est mal connue car elles sont très petites (Lowenstam et Weiner, 1989).

Chaque dent mature d'un Chitonida commun ne contient pas moins de 3 types de minéraux qui occupent différentes localisations (Lowenstam, 1967). La magnétite ($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}\text{O}_4$) est présente à la surface des dents dans les zones utilisées pour râper, ainsi que sur la totalité de la surface postérieure. Le lépidocrocite [$\gamma\text{-FeO(OH)}$] forme une fine couche qui recouvre la surface interne de la magnétite. La dahlite, une apatite carbonatée [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4\text{CO}_3)_3(\text{OH})$], ou pour quelques espèces la francolite, une forme avec de la fluorite, remplissent la partie centrale ainsi que la majorité de la surface antérieure des dents. Chez *Cryptochiton sp.*, la partie centrale est remplie par du phosphate ferrique hydrique amorphe contenant des traces de silice amorphe (opale) à la place de la dahlite et du lépidocrocite (Lowenstam, 1972 ; Lowenstam et Rossman, 1975).

Encart 2 : La trame, une matrice organique préformée, exemple des dents de chitons

Dans la plupart des processus de MBC, l'espace délimité par des couches lipidiques ou par des macromolécules insolubles, est subdivisé par un assemblage de matrice organique appelé « la trame », notamment chez les mollusques. Cette trame est formée avant le processus de biominéralisation (Lowenstam et Weiner, 1989). Le terme « matrice organique » a été utilisé pour la 1^{ère} fois en 1945 chez les os par LeGros Clark (Le Gros Clark, 1945). Ce terme désigne toute surface organique organisée qui agirait comme un médiateur de la minéralisation (Mann, 1983).

Les cellules impliquées dans la délimitation de l'espace synthétisent des macromolécules. Celles-ci sont excrétées dans l'espace extra-cellulaire où elles s'organisent en une trame en 3D. La structure de la trame organique serait perméable aux ions, qui pourraient ainsi diffuser à travers elle jusqu'aux sites de nucléation (initiation de la biominéralisation) (Lowenstam et Weiner, 1989).

Chez les dents de Chitons, la formation de la trame organique se fait entièrement avant la biominéralisation, comme chez les dents des vertébrés. Pendant tout le processus de minéralisation, les dents sont recouvertes par une couche de cellules épithéliales superficielles totalement adhérentes qui forment la trame organique et qui fournissent ensuite les ions pour la biominéralisation. Ces cellules viennent du sac de la radula et contrôlent entièrement le processus de la minéralisation (Nesson et Lowenstam, 1985).

La source de fer nécessaire à cette minéralisation vient de l'hémolymphe (après marquages au ^{59}Fe) (Nesson, 1968). Ce fer est ensuite réduit et solubilisé, puis transporté dans les cellules épithéliales superficielles, où il est temporairement emmagasiné avant la minéralisation de la dent sous forme de ferritine (encart 3) (Nesson et Lowenstam, 1985).

Encart 3 : La délimitation d'un espace (2) rôle de la ferritine

Lors de la formation de la ferritine (un tissu minéralisé comprenant une protéine et un minéral ferreux), une *protéine* appelée apoferritine joue un grand rôle dans la délimitation de l'espace. Cette ferritine est utilisée par de nombreux organismes, des eubactéries aux mammifères dans le but de stocker temporairement des ions, et par les chitons afin de former leurs dents. C'est la seule observation d'une protéine utilisée pour former l'espace nécessaire au dépôt des minéraux (Lowenstam et Weiner, 1989). La ferritine jouerait également un rôle important dans le déroulement des premières étapes de la minéralisation de la coquille du bivalve *Meretrix meretrix* soit lors des différents stades larvaires (Wang et al., 2009).

Lors d'une dernière étape, le degré de cristallisation augmente jusqu'à la fin de la minéralisation de la dent. C'est à ce stade que la couche de cellules épithéliales superficielles adhérentes se détache des calottes dentaires. La dent mature est ainsi libre et peut être utilisée jusqu'à l'usure.

2. 3. 3. Les monoplacophores

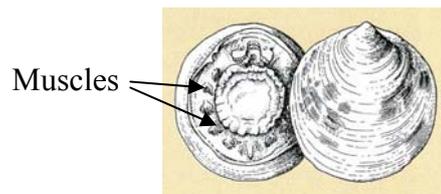


Figure 8 : Un exemple de monoplacophore : *Neopilina galathea* (3,5 cm) (Lecointre et Le Guyader, 2001)

Les monoplacophores ont une coquille en forme de calotte qui est marquée par les stigmates de leurs nombreuses paires de muscles (figure 8). Leurs coquilles sont composées d'aragonite et sont formées de 3 couches minéralisées. La *couche externe* est épaisse et a une structure prismatique sphérulitique régulière. La *couche du milieu* a une structure nacrée. Enfin la *couche interne* est fine et a une structure prismatique (Schmidt, 1959 ; Erben *et al.*, 1968). De plus, leurs coquilles sont recouvertes d'une couche organique externe appelée périostracum (Lemche et Wingstrand, 1959).

2. 3. 4. Les scaphopodes

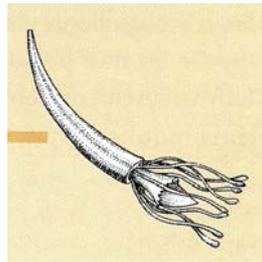


Figure 9 : Exemple de scaphopode : le dentale *Dentalium entalis* (4 cm) (Lecointre et Le Guyader, 2001)

Les coquilles des scaphopodes ont des formes de dents ou de défenses et sont ouvertes (figure 9). Ceci permet aux animaux de positionner leur tête à la profondeur souhaitée dans le sédiment. Cette coquille est composée d'aragonite et est formée de 3 couches minéralisées. La *couche du milieu* est épaisse et a une structure lamellaire-croisée, les *deux couches de surfaces externes et internes* sont fines et ont une structure homogène ou finement prismatique (Boggild, 1930b). Par ailleurs, leur manteau est fusionné et forme un cône cylindrique. Peu de choses sont connues sur leur processus de minéralisation.

2. 4. *Les céphalopodes, bivalves et gastéropodes : la formation de la coquille*

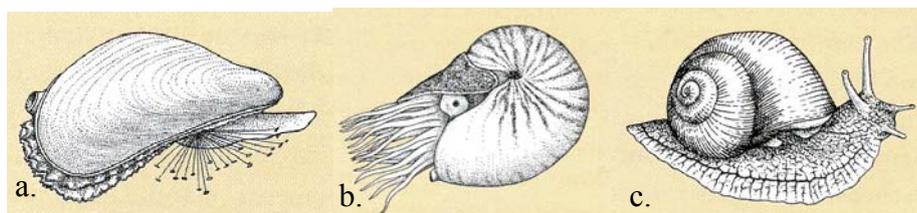


Figure 10 : Exemples de mollusques formant une coquille a. : un bivalve : la moule *Mytilus edulis* (8 cm), b. : un céphalopode : le nautille *Nautilus macromphallus* (jusqu'à 20 cm), un gastéropode : l'escargot de Bourgogne *Helix pomatia* (10 cm) (Lecointre et Le Guyader, 2001)

La palourde japonaise, notre modèle d'étude, est un bivalve. Les spécificités liées à la minéralisation de la coquille de cet animal seront présentées dans cette partie sous forme d'encarts violets.

2. 4. 1. Les différents compartiments

La figure 11 est une coupe anatomique à travers le manteau et la coquille d'un bivalve qui présente les différentes structures impliquées dans la biominéralisation de la coquille. La figure 12 est un diagramme de ces mêmes structures représentées comme une série de compartiments dans lesquels le transport des ions est mis en évidence (Simkiss et Wilbur, 1989).

La figure 11 montre la couche de protéines tannées appelée « le *péριοstracum (P)* ». Cette couche couvre la coquille. Dans cet exemple, la *coquille* est composée de 2 couches ayant des structures cristallines différentes (PR, NC). Le *manteau* est séparé de la surface interne de la coquille par un espace (EPS) appelé « l'*espace extrapalléal* », qui contient le fluide extrapalléal. Le bord et la surface externe du manteau (touchant la coquille) sont couverts par une couche épithéliale composée de plusieurs types cellulaires. Ces cellules sont responsables de la formation du péριοstracum et des couches coquillières. L'épithélium interne du manteau est en contact avec le milieu externe ou la cavité palléale. Pour les organismes aquatiques, cet épithélium pompe activement les ions du milieu extérieur (Simkiss et Wilbur, 1989).

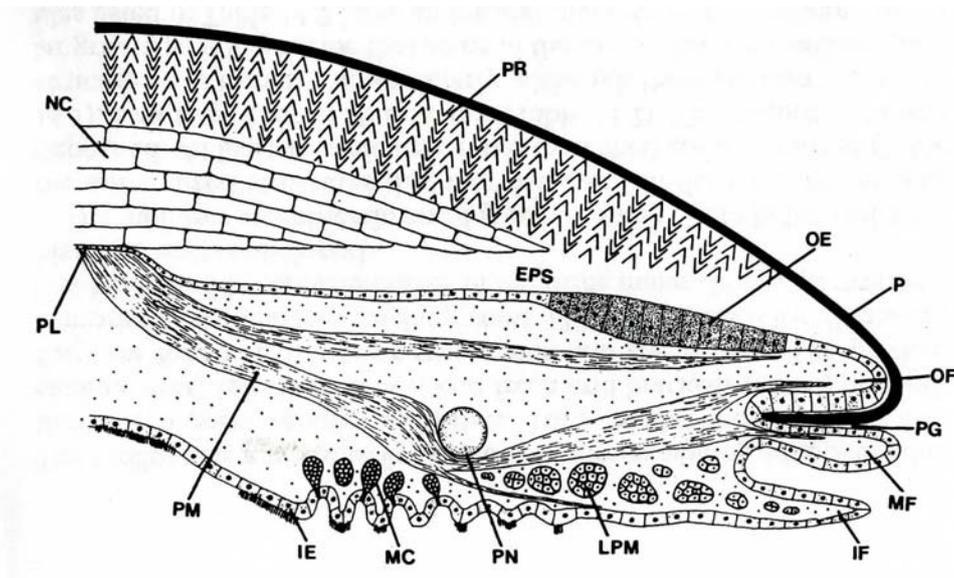


Figure 11 : Section radiale du bord d'une coquille de bivalve, comme par exemple les huîtres perlières, montrant la relation entre la coquille et le manteau. EPS : Espace ExtraPalléal, IE : Epithélium Interne, IF : Pli Interne, MC : Cellules à Mucus, MF : Pli Médian, NC : Couche coquillière interne (par exemple Nacrée), OE : Epithélium externe, OF : Pli externe, P : Péριοstracum, PG : Sillon Péριοstracal, PL : Ligne Palléale, PM : Muscle Palléal, PN : Nerf Palléal, PR : Couche coquillière externe (par exemple PRismatique) (Simkiss et Wilbur, 1989)

Chapitre 1

La figure 12 représente les 6 compartiments impliqués dans la biominéralisation. Le compartiment (1) est le milieu externe ou la cavité palléale, séparé des fluides par l'épithélium du corps (2), (3) l'hémolymphe et les tissus, (4) l'épithélium du manteau, (5) le ou les fluide(s) extrapalléal(aux) et (6) la coquille. Deux points importants peuvent être remarqués. (1) Les mouvements des ions peuvent être bidirectionnels, à la fois vers le milieu externe et vers la coquille. En effet, dans certaines conditions, la coquille peut fournir des ions aux autres parties de l'organisme, c'est un véritable compartiment (cf. 2. 4. 6.) (figure 12). (2) Les ions bicarbonates peuvent avoir une origine double. Ils viennent soit du milieu externe, soit du métabolisme du CO_2 (Simkiss et Wilbur, 1989).

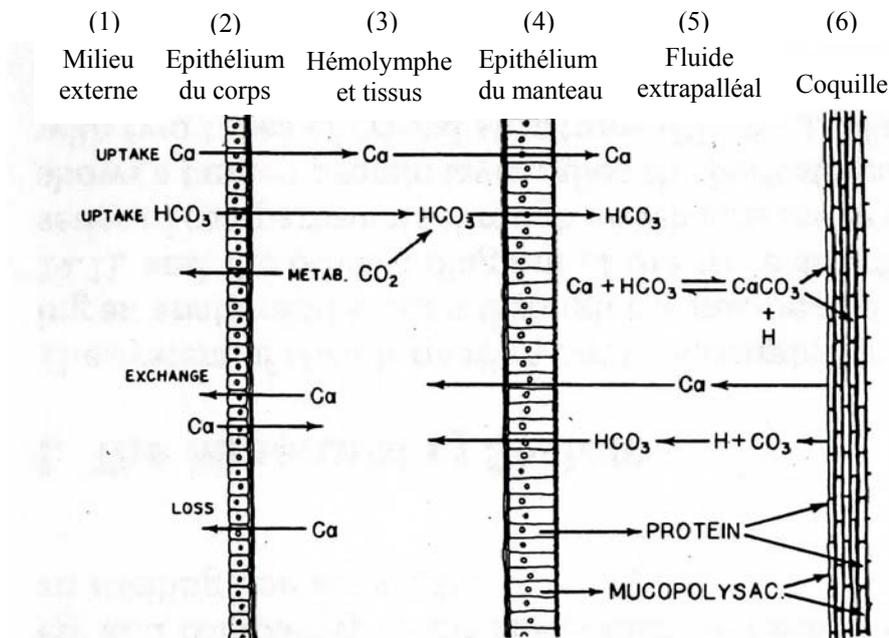


Figure 12 : Le système de minéralisation des mollusques avec (1) le mouvement du Ca et du HCO_3^- depuis le milieu externe jusqu'à la coquille, (2) les sources de HCO_3^- que sont le milieu externe et le métabolisme des tissus, (3) le mouvement du Ca et HCO_3^- vers le milieu externe pendant la dissolution de la coquille, (4) la sécrétion par le manteau du matériel organique de la coquille, (5) les échanges d'ions au niveau de l'épithélium du corps et (6) la coquille (Greenaway, 1971 ; Wilbur et Saleuddin, 1983 ; Simkiss et Wilbur, 1989)

Le calcium vient du milieu externe en passant à travers les cellules épithéliales du corps ou du feuillet interne du manteau. Dans un premier temps, pour les organismes d'eau de mer, le calcium diffuse avec le gradient électrochimique vers le cytosol. Dans un deuxième temps, il est pompé activement vers l'hémolymphe, contre le gradient électrochimique. Cet

ion peut également passer au niveau des espaces intercellulaires. Pour les organismes d'eau douce, la concentration en calcium de l'hémolymphe est supérieure à celle du milieu externe. Dans ce cas, ces ions sont transportés contre les gradients chimiques jusqu'à l'hémolymphe (Simkiss et Wilbur, 1989). C'est pourquoi les organismes d'eau douce et terrestres doivent dépenser plus d'énergie que ceux d'eau de mer pour sécréter des ions destinés aux solutions mères (Lowenstam et Weiner, 1989).

Ensuite, le calcium est transporté à travers les épithéliums du corps et du manteau vers le fluide extrapalléal, puis jusqu'à la surface interne de la coquille sur le site de dépôt des minéraux (Simkiss et Wilbur, 1989).

Les carbonates de calcium se forment par précipitation en solution dans les fluides extrapalléaux (encart 4) à partir d'un anion carbonate et d'un cation calcium selon l'équation suivante : $\text{Ca}^{2+} + 2 \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CaCO}_3 + \text{CO}_2 + \text{OH}^- + \text{H}^+$ (figure 12). Le carbonate de calcium en solution aqueuse cristallise ensuite. Ce phénomène complexe est régulé par de nombreux facteurs physico-chimiques externes comme le pH, la saturation en O_2 , la température, la pression et la présence d'impuretés en solution (des ions ou des macromolécules). De plus, la précipitation du carbonate de calcium est particulièrement influencée par l'équilibre acide-base de l'acide carbonique dans ses différents états de protonation : CO_2 , CO_3^{2-} , HCO_3^- et H_2CO_3 et donc par le pH (Simkiss et Wilbur, 1989).

En résumé, le transport des ions à travers les différents épithéliums du corps mou et les fluides est une étape très importante dans la formation de la coquille.

Encart 4 : L'établissement d'une solution saturée - le fluide extrapalléal

La solution à partir de laquelle le minéral est précipité est appelée la solution mère. C'est le fluide extrapalléal pour la MBC des coquilles de bivalves, gastéropodes et céphalopodes. Une des conditions de la MBC est que cette solution mère doit être saturée, notamment en ions. Des considérations thermodynamiques et cinétiques s'appliquent donc à cette solution limitée à un espace confiné. C'est un contrôle chimique de la biominéralisation (Nancollas, 1977 ; Mann, 1986).

La formation du liquide mère dans les MBC est principalement contrôlée par la ou les cellules responsables de l'orchestration du processus complet de la minéralisation. Soit ces cellules sont organisées de telle manière à délimiter l'espace pour la minéralisation, soit elles sécrètent et contiennent les vésicules dans lesquelles la minéralisation se produit (figure 6). Ce sont les cellules du manteau dans le cas de la formation des coquilles de mollusques. Elles sont équipées de pompes ioniques afin de transporter activement des ions spécifiques dans le compartiment de minéralisation. Ces cellules peuvent également diffuser passivement les ions, via des

canaux ioniques transmembranaires ou directement à travers la membrane suivant le gradient de concentration. Les pompes et les canaux ioniques spécifiques jouent donc un rôle important dans le contrôle de la minéralisation. Ils permettent notamment de contrôler l'ordre dans lequel les ions sont introduits dans le compartiment de biominéralisation (Shapiro et Boyde, 1984 ; Ter Kuile et Erez, 1989), la composition ionique et le degré de saturation (Lowenstam et Weiner, 1989). Ainsi, en contrôlant la saturation des ions essentiels par des mécanismes actifs de transports ioniques, de nombreux organismes sont capables de former des minéraux biogéniques dans des environnements apparemment hostiles à leur précipitation (eau de mer sous-saturée en silice, eau avec des pH acides, domaine marin profond situé en dessous de la limite de compensation des carbonates...) (Lowenstam et Weiner, 1989).

Ce processus de contrôle permet également la configuration des protéines. En effet, toutes les protéines acides essentielles dans la régulation de la biominéralisation étudiées ont besoin d'être associées au calcium pour se plier, et ainsi prendre leur conformation en 3D (figure 19) (Worms et Weiner, 1986 ; Stetler-Stevenson et Veis, 1987). Avant la minéralisation, l'association de la matrice organique insoluble de la trame avec les ions calcium déclenche également sa conformation et donc la subdivision de l'espace délimité, puis la nucléation minérale. Des enzymes modifiant les anions comme la phosphatase alcaline ou l'anhydrase carbonique sont fortement associées à ces processus (Lowenstam et Weiner, 1989).

C'est parce que la composition en ions du liquide mère est différente de celle de l'environnement que beaucoup de minéraux biogéniques formés n'ont pas leurs équivalents purement chimique (Odum, 1951). Par ailleurs, il est surprenant que des organismes vivants dans les milieux saturés en calcite et en aragonite, aient une solution mère régulée pour la minéralisation et ne prennent pas simplement de l'eau de mer filtrée (Lowenstam et Weiner, 1989).

Comme la composition de la solution mère est contrôlée lors de la formation des coquilles, les concentrations en éléments traces et la proportion des différents isotopes stables observées dans les minéraux formés ne correspondent pas toujours avec celles de l'eau environnante. C'est par exemple le cas des coquilles de bivalves (Lowenstam et Weiner, 1989).

Enfin, le liquide mère contient également des macromolécules acides solubles ainsi que d'autres molécules en faible quantité. Toutes ces molécules influencent la biominéralisation.

Pour conclure, l'établissement d'une solution saturée est un processus complexe et indispensable lors d'une MBC, notamment lors de la biominéralisation des coquilles de mollusques.

2. 4. 2. Le manteau

Le manteau est l'organe responsable de la formation de la coquille (cf. 2. 4. 1.). C'est un feuillet fin de tissu d'origine ectodermique, qui recouvre entièrement la surface interne de la coquille. Il forme ainsi une doublure. Il est composé de 2 épithéliums (l'un interne en contact avec l'hémolymphe, l'autre externe en contact avec la coquille) qui sont séparés par du tissu conjonctif (figure 11). Chez les bivalves, le manteau enveloppe complètement le corps mou en formant 2 lobes (encart P1).

L'anatomie du manteau des bivalves est différente de celle des gastéropodes. En effet, le bord du manteau des bivalves a souvent 3 ou 4 plis assez épais alors que les gastéropodes n'en ont que 2 moins épais (Zylstra et al., 1978). Ces plis correspondent au muscle palléal et aux bourrelets impliqués dans la biominéralisation et dans la formation du périostracum (figure 11). Ces plis sont formés par la dilatation du manteau sous l'influence des cellules épithéliales qui sont en division mitotique. Les centres de division sont ainsi étalés tout au long de la bordure du manteau (Kniprath, 1978). Les cellules épithéliales du manteau externe (longeant la coquille) sont responsables de la minéralisation des différentes couches coquillières (figure 11). Elles synthétisent et sécrètent une série de macromolécules, qui s'auto-assemblent à l'extérieur des cellules, et qui contrôlent la minéralisation (cf. 2. 3. 4.). Chez les mollusques qui ont une coquille composée d'une couche interne nacrée et d'une couche externe prismatique, la région du manteau externe ou périphérique contrôle la formation de la couche prismatique et la région centrale du manteau contrôle la formation de la couche nacrée (Sudo *et al.*, 1997 ; Jolly *et al.*, 2004). C'est le même principe pour tous les mollusques ayant une coquille constituée de 2 couches avec des microstructures différentes comme la palourde japonaise.

Par ailleurs, les cellules épithéliales du manteau reçoivent le calcium et le bicarbonate de l'hémolymphe (figures 11 et 12) (Scoffeniels, 1951). Chez les bivalves, les cellules épithéliales qui sont situées à l'intérieur de la ligne palléale (au centre de la coquille), permettent au calcium de diffuser passivement vers le site de minéralisation à travers des canaux présents entre les cellules (Neff, 1972). A l'extérieur de la ligne palléale (sur le bord du manteau), le calcium passe à travers les cellules jusqu'au site de minéralisation (Crenshaw, 1980). Les ions calcium peuvent également être transportés sous forme précipitée et incorporés à des granules intra- ou intercellulaires (Fournié et Chétail, 1982).

Le bord du manteau est la zone de minéralisation la plus active (Wilbur et Jodrey, 1952). Les cellules épithéliales de cette région ont une microstructure assez différente de celles de la zone centrale. Elles sont allongées et contiennent de nombreuses mitochondries, un réticulum endoplasmique bien développé et des appareils de Golgi. En opposition, celles de la zone centrale sont plus cubiques et contiennent moins d'organites (Crenshaw, 1980).

La position du manteau par rapport à la coquille varie en fonction de l'intensité de son activité de biominéralisation. Ce processus est facilité par un mucus que le manteau sécrète (Marie, 2008).

Au cours de la croissance d'un organisme, toute la coquille s'épaissit mais aussi s'agrandit au niveau de sa périphérie afin de contenir tout l'animal mou en croissance. Chez l'escargot d'eau douce *Lymnae stagnalis*, l'agrandissement de la coquille est contrôlé par une hormone de croissance qui régule également la croissance de tous les autres organes (Geraerts, 1976). Cette hormone agit essentiellement sur la première étape de la minéralisation, c'est à dire, pendant l'élaboration du périostracum (Dogterom et Jentjens, 1980). Cette hormone de croissance est également responsable du maintien d'une concentration haute en calcium (Dogterom et al., 1979), et ce par l'intermédiaire d'une protéine fixant le calcium dans le bord du manteau (Dogterom et Doderer, 1981). Un autre exemple de contrôle endocrinien sophistiqué de l'homéostasie du calcium lors de la croissance coquillière des mollusques, est la présence d'un métabolisme actif de la vitamine D chez les escargots terrestres (Weiner, 1979) et dans le bivalve marin *Mytilus edulis* (Lehvaara et Kosinen, 1985).

Encart P1 : Le manteau de la palourde japonaise

Comme tout bivalve la palourde japonaise a un manteau en 2 lobes. Comme les autres vénéréidés, elle présente 4 bourrelets ou plis à la périphérie du manteau : un Bourrelet Externe (BE), 2 Bourrelets Médiants (BM 1 et BM 2) et un Bourrelet Interne (BI) (figure 17) (Paillard et Le Pennec, 1993).

Pour conclure, le manteau est l'organe principal impliqué dans la formation de la coquille chez les mollusques.

2. 4. 3. Le périostracum

Le périostracum est une couche protéique qui couvre soit toute surface externe des coquilles matures de mollusques, soit uniquement la bordure de la coquille en croissance, et ce en fonction des espèces. Sa principale fonction est de protéger les coquilles de

Chapitre 1

l'environnement. Par exemple, il protège les coquilles des mollusques vivant dans des eaux relativement acides comme *Margaritifera ssp.*. Chez ces animaux, les coquilles se dissolvent localement quand le périostracum est abimé. Mais souvent chez les coquilles de mollusques âgées, il a été perdu par abrasion (Clark, 1976).

Chez tous les mollusques, le bord du manteau présente 2 ou 3 plis et donc un ou plusieurs sillons (cf. 2. 4. 2.). Le sillon le plus proche de la surface coquillière est le site de formation du périostracum. Il est formé par un groupe de cellules spécialisées, localisées à la base de ce sillon périostracal (encart P2) (Saleuddin et Petit, 1983 ; Waite, 1983). Les grandes étapes de cette formation sont communes pour toutes les espèces même si quelques détails varient. Le périostracum est formé à partir de macromolécules précurseurs qui acquièrent leur structure dans les dictyosomes de l'appareil de Golgi. Elles sont ensuite sécrétées à l'extérieur des cellules, par l'intermédiaire de vésicules. Puis ces macromolécules s'auto-assemblent en un feuillet large et continu qui émane du sillon. Quelque fois, d'autres cellules du sillon synthétisent du matériel additionnel afin d'épaissir ce feuillet (Saleuddin et Petit, 1983). Le périostracum est un bon exemple de macromolécules polymérisées pour la délimitation de l'espace (encart 5).

La protéine tannée Quinone (Brown, 1952 ; Beedham, 1958) contenant du DOPA (3,4-DihydroxyPhénylAlanine) (Degens et al., 1967) est le principal constituant du périostracum. Par ailleurs, la chitine est un composant mineur du périostracum qui n'est pas toujours présent à des concentrations détectables chez certaines espèces (Peters, 1972 ; Goffinet et Jeuniaux, 1979) et qui est trouvé à de fortes concentrations chez d'autres (Degens et al., 1967).

Les macromolécules du périostracum sont insolubles et donc difficilement étudiées. Cependant, une protéine, la périostracine, a été extraite de la bordure du bivalve *Mytilus edulis* avec de l'acide formique. C'est une forme précurseur du périostracum mature (Waite et al., 1979). Elle a des propriétés originales. En effet, elle est basique, hydrophobe, insoluble dans l'eau et a un poids moléculaire apparent de 22 000 g/mol. Sa forme non purifiée se dégrade et polymérise instantanément. Sa composition est dominée par l'acide aminé glycine (55% molaire), et la DOPA est présente à une concentration de 22 résidus/1000. La DOPA serait formée par une hydroxylation de résidus tyrosiles et sa teneur baisserait avec la sclérotisation (brunissement et durcissement) du périostracum. Elle jouerait donc un grand rôle dans la formation des liaisons entre les macromolécules. Par ailleurs, sa forme pré-DOPA

serait activée pour former une forme agrégative par protéolyse, sans doute grâce à l'enzyme O-diphénoloxidase. Cette enzyme convertit les résidus DOPA en Quinone ou en semi-Quinone (Hillman, 1961 ; Waite, 1983). Enfin, le périostracum mature adhère aux protéines de la matrice coquillière (Waite *et al.*, 1979 ; Waite, 1983).

Par ailleurs, les cellules du sillon périostracal sécrètent également un film liquide contenant des précurseurs protéiques riches en Tyrosine, qui polymérisent également entre eux par des processus de quinonisation (Timmermans, 1969 ; Waite, 1983).

Le périostracum n'a pas de microstructure apparente au niveau moléculaire, même si à une échelle plus grande il est souvent divisé en différentes couches (Kniprath, 1972). Le périostracum du gastéropode *Buccinum redatum* est une exception puisque son périostracum est constitué d'unités assez bien définies, qui sont regroupées, longitudinales et distinctes (Hunt et Oates, 1970, 1978). Ces unités répétées ont des formes d'altères et mesurent 10Å de long (Bouligand, 1965).

Les périostracums matures de l'ensemble des mollusques présentent de fortes variabilités en termes d'épaisseur, d'ultrastructure, de couleur et de texture.

Enfin, le périostracum a aussi une fonction de substrat, de support, sur lequel la minéralisation est initiée (Clark, 1974 ; Iwata, 1980). Il jouerait également un rôle de semi-conducteur en concentrant différemment les ions sur sa surface interne. Ce processus permet ainsi le dépôt des cristaux de carbonate de calcium sur le périostracum par l'intermédiaire de protéines riches en résidus glycines et acides aspartiques (Digby, 1968 ; Cariolou et Morse, 1988).

Chez la moule d'eau douce *Amblema sp.*, le périostracum est très impliqué dans l'organisation des prismes aragonitiques. Cette originalité par rapport aux autres mollusques viendrait du fait que dans son habitat d'eau douce le périostracum serait encore plus nécessaire pour une isolation efficace contre l'environnement (Saleuddin et Petit, 1983).

Le périostracum est également la première couche à être synthétisée lors de l'apparition de la coquille durant les stades précoces du développement larvaire (cf. 3. 1. 4. 2.) (Belefield et Becker, 1991). Même si le périostracum a de nombreuses fonctions essentielles, il reste à ce jour relativement peu connu (Meenakshi et al., 1974a).

Encart 5 : La délimitation d'un espace (3) rôle du périostracum

Un moyen assez fréquent pour délimiter l'espace dans le cadre de la MBC est l'utilisation de *macromolécules insolubles* dans l'eau (protéines ou/et polysaccharides) qui polymérisent pour former une couche imperméable. Un exemple est la protéine périostracine qui est le principal composant du périostracum (Waite et al., 1979). Ces macromolécules du périostracum ainsi que les bicouches lipidiques des cellules épithéliales du manteau sont utilisées simultanément lors de la formation des coquilles de mollusques pour délimiter l'espace (figure 6). Ceci est possible parce que le périostracum est un feuillet continu, depuis le sillon du manteau jusqu'à la surface externe de la coquille. Cette continuité n'est pas interrompue par les mouvements du manteau puisque le périostracum est flexible quelques temps après sa formation soit avant la sclérotisation (Clark, 1976).

La délimitation de l'espace de la minéralisation permet de contrôler la composition du liquide mère à l'origine de la minéralisation (encart 4). Chez quelques organismes, les barrières délimitant cet espace réguleraient également la formation des minéraux. Par exemple, le périostracum facilite la minéralisation grâce à ses propriétés semi-conductrices (Digby, 1965, 1968).

Encart P2 : Le périostracum de la palourde japonaise

Dans un premier temps, la lame périostracale de la palourde japonaise est secrétée par les cellules épithéliales de la glande périostracale présente sur la surface interne du bourrelet externe du manteau (entre le Bourrelet Externe et le Bourrelet Médian 1), soit au niveau du sillon périostracal (figures, 13 - 17). Cette lame périostracale est composée de 2 couches majeures : la couche externe ou périostracum et la couche interne formée d'une matrice fibreuse. Le périostracum recouvre ensuite la surface externe de la coquille alors que la matrice fibreuse contribue à la croissance coquillière. Le périostracum est très fin, iridescent et fortement attaché à la coquille (Paillard et Le Pennec, 1993). Rien n'est connu sur la biochimie du périostracum de la palourde japonaise.

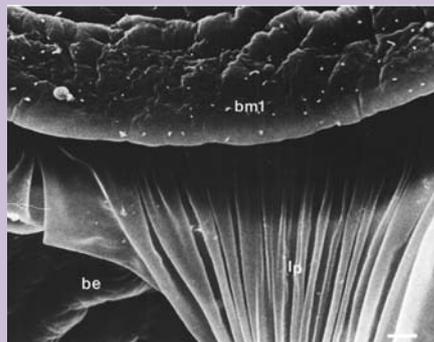


Figure 13 : Vue au MEB de la lame périostracale sur le bord palléal (lp) d'après Paillard (1992), bm1 : bourrelet médian primaire, be : bourrelet externe.

2. 4. 4. La coquille et le processus de biominéralisation

La coquille des mollusques est la structure calcifiée la plus étudiée chez les invertébrés. Chez les bivalves, elle est constituée de 2 valves. L'organisation et la formation de la *nacre* (aragonite) sont les processus de minéralisation les plus étudiés chez les mollusques. Comme sa structure est assez simple, elle a pu être étudiée à une petite échelle. C'est pour cette raison que ce modèle sera particulièrement décrit dans cette partie.

2. 4. 4. 1. La structure de la coquille

Les coquilles de mollusques ont une structure en couches (figure 14) et sont composées de carbonate de calcium (encart P3). Elles sont également constituées d'une petite partie de matériel organique (habituellement entre 0.01% et 5% w/w) (Hare et Abelson, 1965 ; Goffinet et Jeuniaux, 1979). Dans tous les cas, les différentes couches ont des motifs microstructuraux différents, formant ainsi de nombreuses combinaisons. Ces motifs structuraux basiques sont bien connus. De plus, la distribution des couches de coquille peut être assez complexe quand 2 couches adjacentes s'entremêlent (Boggild, 1930b ; Carter, 1980 ; Carter et Clark, 1985).

Chez certaines espèces, il existe une fine couche coquillière additionnelle appelée « myostracum », qui est formée au niveau du site d'attachement des muscles sur la coquille (figure 14). Ces couches myostracales sont aragonitiques et ont une microstructure prismatique. Au fur et à mesure de la croissance de la coquille, les aires d'attachement des muscles avancent et forment une traînée de myostracum. Celle-ci est ensuite recouverte par les couches coquillières internes (Lowenstam et Weiner, 1989).

Par ailleurs, l'ensemble des couches calcifiées de la coquille sont recouvertes d'une fine couche organique en contact direct avec le milieu extérieur, le périostracum (figure 14) (cf. 2. 4. 3.).

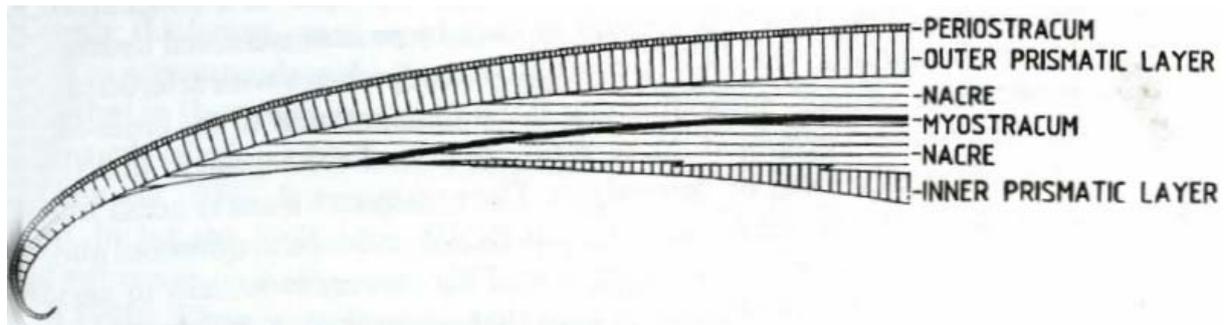


Figure 14 : Schéma d'une section transverse de la zone postérieure d'une coquille de bivalves nacrés (couche interne formée de nacre aragonitique) (Lowenstam et Weiner, 1989)

Les mollusques forment une gamme très diverse de types microstructuraux coquilliers. Environ 50 types et sous-types ont été décrits (Carter et Clark, 1985), mais seulement une dizaine de types sont dominants. Ces structures sont principalement les microstructures prismatiques, prismatiques composites, nacrées (et sous-nacrées), lamellaires croisées, lamellaires croisées complexes, foliées, granulaires et homogènes (figure 15). Par exemple, dans le cas de la nacre, les cristaux d'aragonite ont une forme de tablettes. Dans ce cas, leur épaisseur est très uniforme chez une espèce donnée mais varie d'une espèce à une autre (Watabe, 1965). De plus, comme la longueur et la largeur des tablettes varient considérablement, et ce même à l'intérieur d'une couche unique, les processus qui contrôlent la 3^{ème} dimension seraient donc différents de ceux des 2 autres (Weiner, 1986). La présence des différents types de microstructures et des différents polymorphes cristallins dépend des différents taxons ainsi que de la nature des macromolécules de la trame (Takeuchi et Endo, 2005). Cependant, certaines conditions expérimentales de culture ont pu modifier l'organisation des coquilles néoformées (Checa et al., 2006).

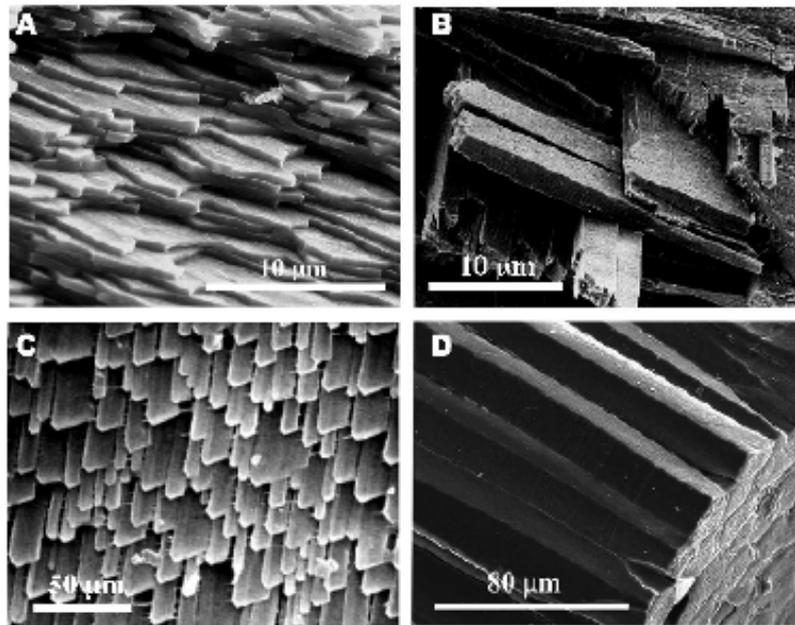


Figure 15 : Observations au MEB des 4 principaux types microstructuraux des coquilles de mollusques. A : la structure nacréée sur une cassure fraîche de coquille du gastéropode marin *Haliotis tuberculata* (Marin et al., 2008), B : la structure lamellaire-croisée sur une cassure fraîche de coquille du gastéropode terrestre *Conus virgo* (Simkiss et Wilbur, 1989), C : la calcite foliée sur une coquille du bivalve *Pecten maximus*, en vue interne (Dauphin et al., 2007), D : la structure prismatique sur une cassure fraîche d'une coquille du bivalve *Atrina rigida*, en vue interne (Marin et al., 2008)

Encart P3 : La coquille de la palourde japonaise

La coquille de la palourde japonaise est constituée de 2 valves identiques ou « équivalves » formées par 2 couches coquillières (figure 16). La couche externe a une structure composite prismatique et la couche interne a une structure homogène. Une couche coquillière de type composite prismatique est composée de prismes qui se développent parallèlement, de la charnière vers le bord de la coquille, où ils divergent à la manière d'un éventail. Une couche coquillière de structure homogène est constituée de cristaux granulaires agrégés de diverses tailles et formes (Boggild, 1930a ; Taylor *et al.*, 1973 ; Shimamoto, 1986 ; Popov, 1992). Par ailleurs, ces deux couches sont composées de carbonate de calcium sous forme de cristaux d'aragonite (Taylor et al., 1973).

Comme tous les bivalves fouisseurs, la palourde japonaise a une coquille aplatie, épaisse et ovale (Lecointre et Le Guyader, 2001 ; Gosling, 2003).

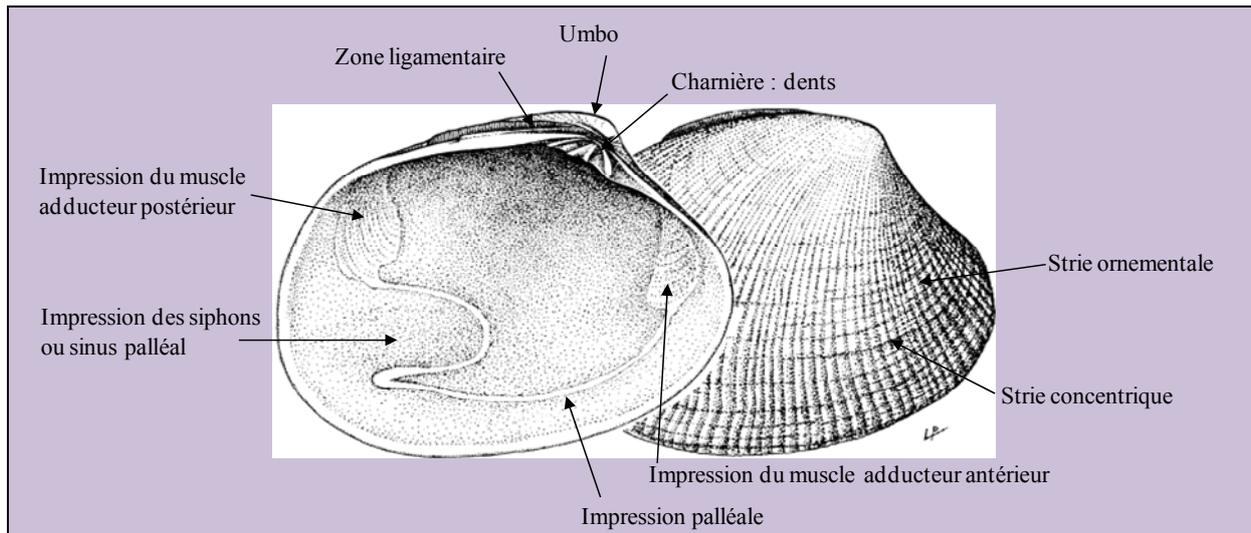


Figure 16 : Morphologie interne et externe de la coquille de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* d'après (Gouletquer, 2006)

Au niveau de la *face externe* de la coquille, des *stries* sont visibles dans la couche prismatique (figure 16). Il existe des stries concentriques courbes et parallèles au bord de la coquille. Ces stries sont les stries de croissance (figure 16). Elles dépendent principalement des saisons hivernales (quand les palourdes grandissent moins), mais également de la salinité et de la reproduction. Il existe aussi des stries d'ornementation rayonnantes perpendiculaires aux stries de croissance (figure 16). La pigmentation de cette face externe est très variable en couleurs et en motifs : marron, beige, bleue, orange, blanc, violet (Quéro et Vayne, 1998 ; Gouletquer, 2006).

La *face interne* homogène de la coquille de palourde a également une coloration variée : blanc, beige, violet, jaune. La partie dorsale correspond à la *charnière* et la partie ventrale est à l'opposée. La partie postérieure est située au niveau des siphons et la partie antérieure est à l'opposée. Au niveau dorsal, se trouve la charnière composée de 3 dents cardinales bifides et d'aucune dent latérale. A chacune de ces 3 dents correspond une cavité sur l'autre valve, dans lesquelles elles rentrent quand la palourde se ferme. C'est grâce à ce mécanisme que les valves ne se décalent pas l'une par rapport à l'autre (Le Pennec, 1973 ; Gosling, 2003 ; Gouletquer, 2006).

Juste à coté de cette charnière, au niveau antérieur se situe l'*umbo*, une excroissance de la coquille. Au niveau postérieur par rapport à la charnière se trouve le *ligament*. Ce ligament permet le maintien des deux valves ouvertes d'une façon passive alors que les muscles adducteurs contrôlent la fermeture de la coquille et ce d'une manière active. Le ligament est un organe épais, brun, elliptique et courbé. Il a une composition très proche de la matrice coquillière de la palourde japonaise en termes d'acides aminés (Gosling, 2003 ; Gouletquer, 2006).

Au niveau ventral, la figure 16 montre l'*impression palléale*, qui correspond à l'ancrage du manteau sur la coquille. Au niveau postérieur, un *sinus palléal* relativement profond est visible. Il est arrondi et assez bien développé, mais il n'atteint pas la ligne médiane des

valves. C'est la marque de l'ancrage des siphons rétracteurs sur la coquille (Quéro et Vayne, 1998 ; Gosling, 2003 ; Gouletquer, 2006) .

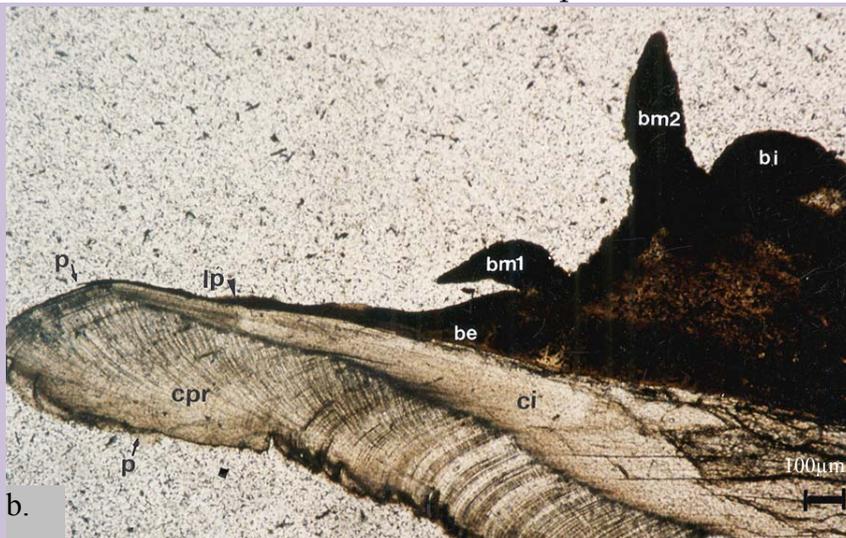
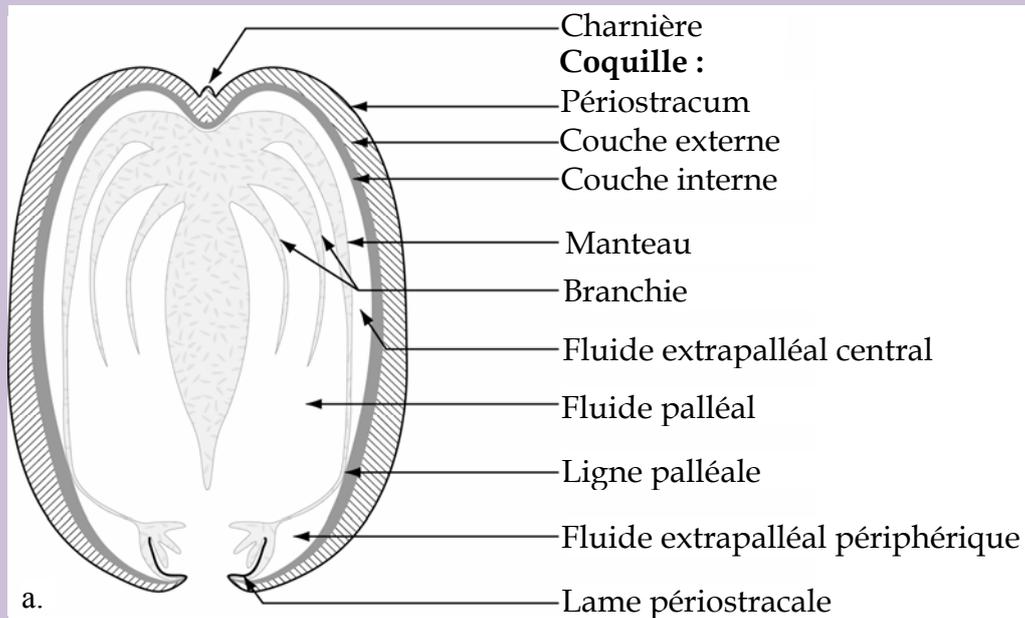


Figure 17 : Coupes de palourdes japonaises illustrant les différents compartiments de la minéralisation. a. : schéma d'après (Paillard, 2004b). b. Coupe transversale non décalcifiée du bord d'une coquille, be : bourrelet externe, bi : bourrelet interne, bm1 : bourrelet médian primaire, bm2 : bourrelet médian secondaire, ci : couche interne coquillière, cpr : couche prismatique coquillière, lp : lame périostracale, p : périostracum, d'après (Paillard, 1992)

La croissance de la palourde japonaise varie beaucoup en fonction de la saison, du site, de la densité des animaux et de la nourriture disponible. La croissance s'arrête totalement pendant l'hiver et est maximale au printemps et en été. Ces variations annuelles sont parfois très marquées. Elles sont principalement liées aux conditions climatiques (Quéro et Vayne, 1998).

2. 4. 4. 2. La croissance coquillière

La croissance de la coquille est un phénomène qui se produit continuellement pendant toute la vie de l'animal. Elle est donc dite « continue ». Cependant, la vitesse de calcification évolue en fonction des saisons, de l'activité métabolique et de la nutrition de l'animal, ainsi que de la température du milieu (encart P3). Les « lignes de croissance » ou « stries » de la coquille sont un enregistrement de l'histoire de la vie de l'organisme.

Par ailleurs, les différentes stries constituent un archivage des conditions environnementales. En effet, l'analyse géochimique de ces couches permet de quantifier les variations au cours du temps de paramètres environnementaux tels que la température, la salinité et la composition chimique du milieu (Ravera *et al.*, 2003 ; Ricken *et al.*, 2003 ; Auclair *et al.*, 2004 ; Gillikin *et al.*, 2006).

La formation de la coquille des mollusques est un phénomène complexe et très contrôlé par les organismes, notamment par le manteau (cf. 2. 4. 2.). En effet, l'expression d'une série de gènes spécifiques et plus généralistes ordonne l'activité des cellules minéralisantes du manteau (Wilbur et Jodrey, 1955 ; Kunigelis et Saleuddin, 1978 ; Nederbragt *et al.*, 2002 ; Schonitzer et Weiss, 2007).

2. 4. 4. 3. La nucléation et les axes cristallographiques

La nucléation et l'orientation des axes cristallographiques dans les coquilles de mollusques notamment dans la nacre sont particulièrement bien étudiées (Encarts 5 et 6). La nacre est une microstructure aragonitique présente chez les gastéropodes, les bivalves et les céphalopodes.

Encart 5 : Le contrôle de la nucléation

Le terme « nucléation » signifie l'initiation de la minéralisation au niveau de régions précises que sont les nucléus. C'est le premier stade de la formation d'un cristal. Dans une solution saturée, les ions et les solutés présents forment des agrégats. Chacun de ces agrégats peut soit être dissocié, soit continuer à croître pour former un cristal.

Chez de nombreux organismes, la nucléation est régulée dans le but de contrôler la biominéralisation. En effet, certaines macromolécules présentes dans la solution saturée peuvent favoriser la formation d'un cristal en stabilisant les agrégats formés, afin d'enclencher la biominéralisation. Ce processus de nucléation, ainsi que l'intensité de son contrôle, présentent une forte variabilité dans le monde du vivant. Cela peut aller d'aucun contrôle à un contrôle très fort. Dans le cas où ce processus n'est pas contrôlé comme lors de la formation de quelques types minéraux amorphes, les organismes contrôlent quand même d'autres aspects de la minéralisation (Weiner, 1986).

Le contrôle de la nucléation est dit « *direct* » quand la nucléation se produit sur des surfaces solides spécialement créées et non en suspension. Dans ce cas, la nucléation est plus contrôlable car elle est limitée aux surfaces solides sur lesquelles les agrégats d'ions et de solutés doivent s'associer. Les mollusques ont principalement ce type de contrôle. Par exemple, *in vitro*, les glycoprotéines acides issues de coquilles de mollusques en solution sont des inhibiteurs de la nucléation des cristaux de calcites, alors que celles adsorbées sur un substrat solide deviennent des nucléateurs (Addadi et Weiner, 1985).

Afin de comprendre la nucléation biologiquement contrôlée, il est nécessaire de connaître la structure moléculaire et ionique du site de nucléation et du substrat, ainsi que leurs agencements et leurs relations en 3D. Les deux principaux types de substrats impliqués dans la nucléation sont les membranes bicouches lipidiques des vésicules ainsi que les glycoprotéines et protéoglycanes acides localisées à la surface des trames organiques. Ces macromolécules acides peu caractérisées sont intimement associées à la phase minérale (Lowenstam et Weiner, 1989). Ce dernier type de substrat est particulièrement utilisé lors de la formation des coquilles de mollusques.

Dans les tissus minéralisés fonctionnant avec ce type de nucléation, un même site de nucléation peut ne produire qu'un seul cristal ou bien de multiples cristaux. La nucléation d'un cristal unique est présente dans la nacre et dans la couche prismatique des mollusques. La nucléation de multiples cristaux est trouvée dans d'autres microstructures rencontrées chez les mollusques. La taille des cristaux uniques ou des sphérulites dépend directement de la distance qui les sépare de leur site de nucléation (Carter et Clark, 1985).

La nucléation est facilitée par la formation de liaisons entre les minéraux et les molécules organiques de la matrice. Par exemple, certaines protéines des matrices coquillères de mollusques sont capables d'initier la nucléation grâce à leur capacité à fixer du calcium (Simkiss et Wilbur, 1989). Cette capacité est due (1) à une forte

teneur en acides aspartiques et glutamiques avec des groupes COO^- (Weiner, 1979 ; Weiner et Traub, 1981), (2) aux groupes esters sulfatés avec une probable charge négative sur les résidus héxosamines (Crenshaw, 1982) et (3) à une séquence d'acides aminés spécifiques (Samata et al., 1980). La liaison avec les ions calcium (Ca^{2+}) permet d'attirer les ions carbonates (CO_3^{2-}). Si ces ions sont en quantité suffisante, cela induit la formation du nucléus. A ce moment le nucléus serait fixé et orienté sur le substrat protéique (Simkiss et Wilbur, 1989). Lors d'une expérience *in vitro* la plus proche possible de l'*in vivo*, Addadi et al. (1987) ont montré que la nucléation cristalline calcique dépendait également d'une coopération entre les ligands sulfatés liés à un substrat artificiel de polystyrène et les ligands carboxylates de polyaspartates avec une conformation en feuillet β . Ces ligands concentrent le calcium sur le site de nucléation qui est ordonné avec une conformation en feuillet β également (figure 18). Cette même étude montrait un phénomène similaire en ajoutant des macromolécules coquillères de mollusques. Leurs polysaccharides ainsi que leurs glycoprotéines ont des groupes fonctionnels très sulfatés. De plus, les protéines riches en acides aspartiques adoptent une conformation en feuillet β en présence de calcium (Addadi et al., 1987).

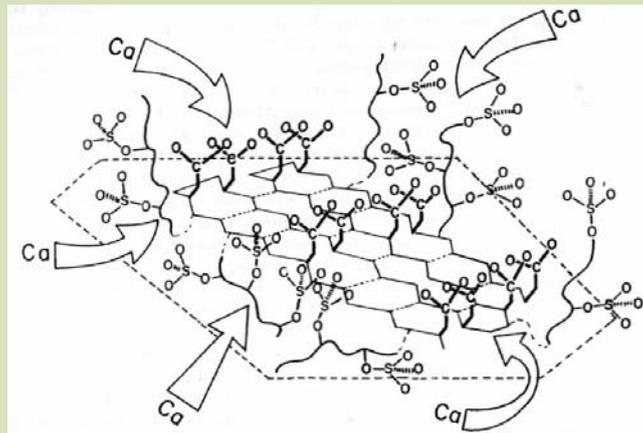


Figure 18 : Illustration schématique d'un site possible de nucléation pour la formation de la coquille des mollusques, comprenant une protéine dans la conformation en feuillet β adsorbée sur un substrat solide et ayant des liaisons covalentes avec des polysaccharides sulfatés. Les flèches montrent les flux hypothétiques d'ions calcium vers le site protéique de nucléation (Addadi et al., 1987 ; Lowenstam et Weiner, 1989)

Quelques études *in vivo* ont été faites sur le site de nucléation de la nacre des mollusques. Une étude à la microsonde a montré que le site de nucléation est riche en soufre et donc peut être composé de protéoglycannes (Wada, 1980). Des analyses histochimiques ont également montré que le site de nucléation de la nacre de *Nautilus pompilius* est capable de fixer le calcium et contient des polysaccharides sulfatés (Crenshaw et Ristedt, 1976). Par ailleurs, le périostacum des mollusques induit la nucléation des cristaux de la couche minéralisée externe de la coquille et sert de support à leur croissance ainsi qu'à leur organisation structurale (Meenakshi et al., 1974a). Par exemple, Checa et al., 2005 ont montré que chez les bivalves *Periidae*, les cristaux précoces sont nucléés sur le périostacum recouvrant la couche prismatique (Checa et Rodriguez-Navarro, 2005).

Encart 6 : Le contrôle de l'orientation de la croissance cristalline (1) cas de la nacre

Chez les mollusques, la croissance cristalline est orientée par les macromolécules voisines des sites de nucléation selon 3 axes appelés « axes cristallographiques » *a*, *b* et *c* (figure 19).

L'orientation de la croissance cristalline dépend de la relation spatiale, à un niveau moléculaire, entre le cristal et la structure du substrat macromoléculaire du site de nucléation à partir duquel il se forme. Ces relations spatiales entre le minéral et le substrat organique peuvent être très fortes, variables quand la nucléation n'est pas fortement contrôlée, ou inexistantes. L'induction de la croissance orientée d'un cristal par un support organique insoluble est définie par le terme d'« épitaxie ». Cette induction est retrouvée lors de la formation de la coquille des mollusques (Weiner et Traub, 1981, 1984). Ce processus est l'un des concepts fondamentaux du modèle de biominéralisation orchestrée par une matrice organique. C'est par ce processus qu'un nucléus en croissance peut envahir d'autres (Posner et Betts, 1981 ; Simkiss et Wilbur, 1989). Les cristaux néoformés croissent par addition progressive de molécules et d'ions. La morphologie du cristal est déterminée par la vitesse relative de la croissance du cristal dans les différents plans de l'espace comme lors de la formation de la nacre (figure 19) (Weiner, 1986 ; Lowenstam et Weiner, 1989).

Les relations spatiales minéral/substrat à une échelle moléculaire ont été très bien décrites et illustrées dans le cas de la nacre des mollusques.

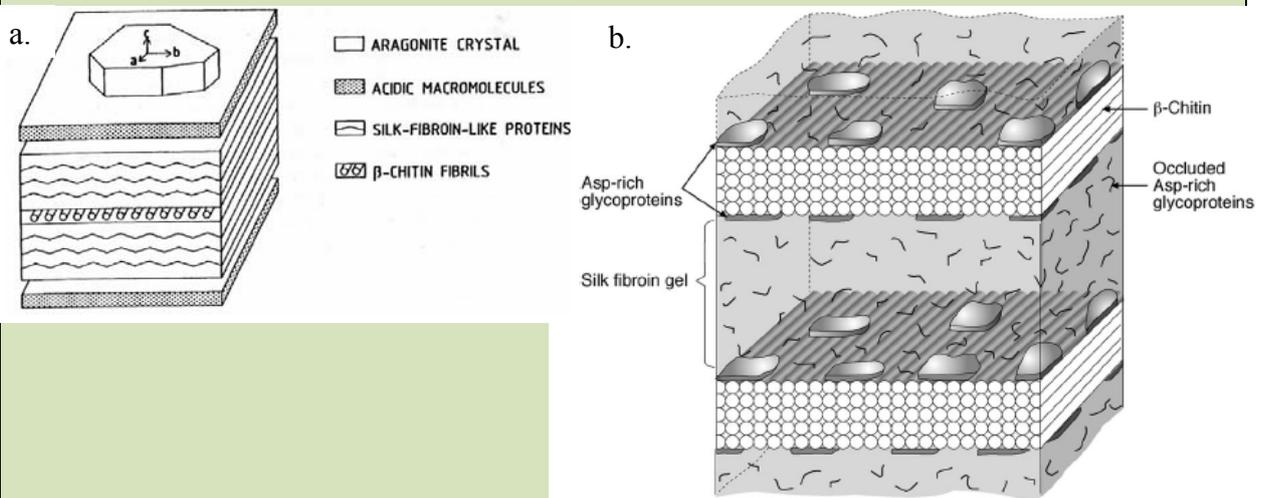


Figure 19 : a. Illustration schématique datant de 1989 des relations entre les cristaux et la matrice organique dans la couche nacrée aragonitique des coquilles des mollusques. Ce schéma montre bien les axes cristallographiques de la nacre (Lowenstam et Weiner, 1989), b. Représentation schématique datant de 2001 de la structure de la matrice organique de la couche nacrée déminéralisée d'*Atrina* (Levi-Kalisman *et al.*, 2001)

Dans la *nacre des mollusques*, l'orientation des 3 axes cristallographiques de l'aragonite est connue (figure 19 a.). Elle dépendrait dans un premier temps de la

trame organique qui est constituée de β -chitine (des protéines fibreuses et soyeuses en feuillets β), de glycoprotéines riches en acides aspartiques et des soies fibreuses formant un gel (Weiner *et al.*, 1983a ; Levi-Kalisman *et al.*, 2001). Dans les 3 classes majeures des mollusques (gastéropodes, bivalves et céphalopodes), l'axe cristallographique de l'aragonite a serait aligné avec les fibres de la β -chitine, l'axe cristallographique b avec les chaînes protéiques polypeptidiques liées à la chitine, et l'axe c serait perpendiculaire à la surface de nucléation (Weiner *et al.*, 1983a). Les macromolécules acides formant des plaques denses aux électrons, fonctionneraient comme des sites de nucléations pour la formation des minéraux. Ceci expliquerait les alignements entre la chitine des feuillets de matrice et les axes cristallographiques observés par Weiner *et al.*, (1983a) (Levi-Kalisman *et al.*, 2001). Une fois la mise en place de la matrice organique, le gel hydraté de soies fibreuses pourrait être remplacé par le minéral, les soies devenant ainsi reléguées aux espaces intra et intercrystallins (Levi-Kalisman *et al.*, 2001).

Checa *et al.* ont montré qu'après leur nucléation sur le périostracum (encart 5), les cristaux forment des agrégats polycristallins de diverses formes et qui fixent dans un premier temps aux prismes. Ces cristaux envahissent ensuite progressivement les prismes d'une façon centripète (Checa et Rodriguez-Navarro, 2005). Au début, l'axe c est perpendiculaire au substrat et les axes a et b ont des arrangements variés. Ensuite, au fur et à mesure de leur croissance, les cristaux de nacre s'individualisent et acquièrent une orientation cristallographique commune dans le plan a - b (axe b dans la direction de la croissance coquillière). Cette orientation a été expliquée par Checa et Rodriguez-Navarro comme le résultat d'une compétition entre les cristaux qui sont adjacents à l'intérieur des lamelles de tablettes de nacre. Cette compétition est particulièrement forte au niveau des fronts de croissance de ces lamelles qui sont alors bien délimités. Ensuite, ces fronts de croissance deviennent plus diffus et la nacre met alors plus de temps à s'organiser (Checa et Rodriguez-Navarro, 2005 ; Checa *et al.*, 2006).

Cette hypothèse ne semble pas s'appliquer aux gastéropodes. C'est une hypothèse alternative à celle qui dit que la matrice organique est le seul régulateur de l'orientation de la croissance cristalline. De plus, elle est compatible avec une croissance par « épitaxie » (Checa et Rodriguez-Navarro, 2005 ; Checa *et al.*, 2006).

Dans la nacre des gastéropodes, les cristaux d'aragonite sont tous orientés au hasard dans la dimension c (Wise, 1970). Dans les dimensions a et b , les cristaux de nacre du bivalve *Mytilus californianus* et du céphalopode *Nautilus repertus* ne montrent qu'une orientation préférentielle alors que ceux des bivalves *Neotrigonia margaritacea* et *Pinctada margaritifera* sont parfaitement alignés sur des grandes distances de l'ordre de quelques millimètres. Ces différences s'expliquent par les variations de l'activité des différentes cellules du manteau. En effet, chez *N. margaritacea* et chez *P. margaritifera*, de nombreuses cellules construisent des sites de nucléation parfaitement alignés (Weiner *et al.*, 1983a).

Les *faces cristallines* peuvent également jouer un rôle important dans le contrôle de la croissance cristalline, notamment en termes d'interactions entre les protéines acides et les cristaux, ainsi que dans l'orientation des axes (Addadi *et*

Weiner, 1985). Certaines faces cristallines ont des propriétés stéréochimiques particulières qui leur permettent d'interagir plus fortement et plus efficacement avec les protéines acides que les autres faces. Ces faces ont des propriétés différentes en fonction du type de microstructure. Par exemple, les faces cristallines calcitiques de couches foliées chez de nombreux bivalves ont été étudiées. Ces couches foliées calcitiques sont composées de fin feuillets (environ 250nm) plus ou moins parallèles, qui sont souvent inclinés avec un angle inférieur à 10° avec la surface de la coquille. Trois différents types de couches foliées ont été observés. Ces 3 types de minéraux ont des faces cristallines différentes. Par ailleurs, un autre type de face est exprimé dans les surfaces supérieures et inférieures des tablettes de nacre aragonitiques (Runnegar, 1964).

En conclusion, le contrôle de la nucléation et de l'orientation de la croissance cristalline sont des étapes importantes de la MBC des coquilles de mollusques.

2. 4. 4. 4. Les différents polymorphes

Le carbonate de calcium peut précipiter en six polymorphes de structures différentes : la calcite, l'aragonite, la vatérite (figure 20), le carbonate de calcium monohydraté, le carbonate de calcium hexahydraté et le carbonate de calcium amorphe. Seuls la calcite et l'aragonite (par ordre décroissant de stabilité à température ambiante et d'abondance) sont thermodynamiquement stables et sont utilisés pour la biominéralisation à grande échelle. Les carbonates de calcium sont les minéraux les plus utilisés dans le monde de la biominéralisation. La calcite est par exemple présente chez *Crassostrea gigas* (Carriker, 1996), l'aragonite chez *Mercenaria mercenaria* (Taylor et al., 1973), et la vatérite dans les perles cultivées d'eau douce de *Hyriopsis sp.* (Jacobs et al., 2008). La localisation de ces 3 polymorphes dans les coquilles des différents taxons est bien connu (Boggild, 1930b). Lorsque l'aragonite et la calcite sont présents dans la même coquille, ils sont séparés dans l'espace en couches différentes.

Certains cations divalents tel que le magnésium, peuvent être incorporés en grande quantité au moment de la précipitation du carbonate de calcium, comme par exemple pour la calcite magnésienne. La formation de certains polymorphes et la morphologie des cristaux sont déterminées par les interactions moléculaires entre les différents constituants, mais aussi par les facteurs physico-chimiques externes (Lowenstam, 1954). Cependant, dans de nombreux cas, les mollusques semblent capables de contrôler strictement le polymorphe cristallin qui est formé (encart 7).

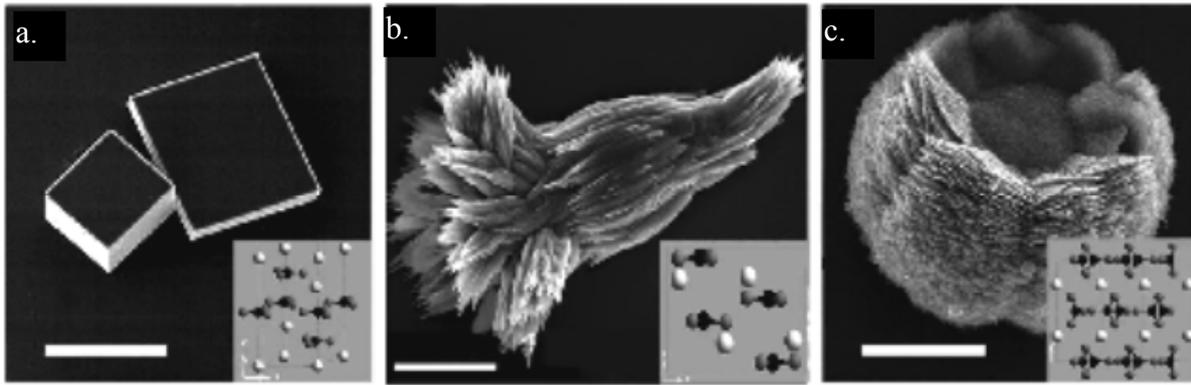


Figure 20 : Observations au MEB des différents polymorphes cristallins du carbonate de calcium précipités *in vitro* à partir d'une solution saturée. a : Des cristaux de calcite présentant une forme rhomboédrique caractéristique, barre d'échelle = 20 µm (Marie, 2008), b : Des cristaux d'aragonite prenant une forme typique en agrégat d'aiguilles, barre d'échelle = 5 µm (Yan et al., 2007), et c : Des cristaux de vaterite, le polymorphe cristallin le plus instable thermodynamiquement, barre d'échelle = 20 µm (Marie, 2008), encarts : représentation des unités des organisations ioniques typiques des différents polymorphes (Addadi et al., 2008)

Le carbonate de calcium amorphe joue un rôle dans la formation des coquilles. En effet, il a été observé plusieurs fois dans la première coquille des bivalves (Medakovic et al., 1997 ; Weiss et al., 2002), dans la zone de croissance des coquilles de gastéropodes adultes (Marxen et al., 2003), et dans la zone périphérique des tablettes de nacre (Nassif et al., 2005). La formation de ce carbonate de calcium amorphe comporte plusieurs avantages. En effet, elle requiert moins d'énergie. Elle permet une incorporation des impuretés plus facilement que dans les formes cristallines et le minéral formé est plus facilement solubilisable ou remodelable. Ainsi, la totalité de la phase cristalline des coquilles de mollusques se formerait *via* cette phase amorphe. De plus, la conversion de la phase amorphe en phase cristalline se produirait par simple perte d'eau. En effet, les cristaux se formeraient par déshydratation progressive d'un hydrogel sursaturé en ions et qui contiendrait les macromolécules de la matrice organique (Addadi et al., 2005).

Encart 7 : Le contrôle de l'orientation de la croissance cristalline (2) influence sur la nature du polymorphe

Le type de minéral formé lors de la nucléation dépend de la structure moléculaire du site de nucléation. La matrice organique contrôle quel polymorphe de carbonate de calcium les organismes forment (Hare, 1963). Par ailleurs, certaines macromolécules de la matrice organique favorisent la formation de certains polymorphes cristallins plus ou moins stables, comme le carbonate de calcium amorphe au début de la formation des coquilles de mollusques (Falini et al., 1996 ; Nassif et al., 2005).

2. 4. 4. 5. La matrice organique

Chez les eucaryotes, toutes les biominéralisations contrôlées de carbonate de calcium sont associées à une matrice organique. Celle-ci est impliquée dans de nombreuses fonctions essentielles comme la nucléation des cristaux, le contrôle de la structure des cristaux, ainsi que l'inhibition de la croissance des cristaux (encarts 8 et 9) (Mann, 1988).

Encart 8 : Le contrôle de la croissance cristalline- cas des mollusques

Les organismes peuvent directement influencer la formation des cristaux pendant leur croissance, notamment par l'intermédiaire des macromolécules spécifiques. Le processus dépend de lois stéréochimiques (Addadi et al., 1985). *In vitro et in vivo*, ces composés spécifiques peuvent être des protéines et des glycoprotéines acides venant des tissus minéralisés. En effet, dans les coquilles de mollusques, la morphologie des cristaux dépend de ces macromolécules associées.

Par exemple, les nacres de 2 espèces différentes de bivalves nacrés (aragonite) *Neotrigonia margaritacea* et *Brachiodontus variabilis* présentent des microstructures avec des morphologies différentes parce qu'ils synthétisent des macromolécules qui sont différentes (Lowenstam et Weiner, 1989).

Ces macromolécules acides présentent également une capacité à stabiliser la formation de faces cristallines non conventionnelles. Elles modifient ainsi la croissance des cristaux formés *in vitro* (Albeck et al., 1996a ; Albeck et al., 1996b). Comme la taille de ces macromolécules est bien supérieure à celle du réseau cristallin, leur inclusion dans le cristal néoformé modifie les paramètres de maille du cristal (Pokroy et al., 2006).

Encart 9 : La cessation de la croissance cristalline - cas des mollusques

Le contrôle de l'arrêt de la biominéralisation détermine la forme globale du matériel. Quand la phase minérale est amorphe, la forme finale du minéral est souvent la même que celle de l'espace dans lequel il précipite. Cette étape de cessation de la croissance cristalline est fondamentale et est la dernière du processus de MBC.

Chez les mollusques, la cessation de la croissance cristalline est principalement régulée par les macromolécules de la matrice, mais peut parfois se faire par une vésicule. Dans le premier cas, les cristaux se forment dans des espaces limités par des *macromolécules de la matrice* et s'arrêtent de croître quand ils rentrent en contact avec la surface de la matrice préformée. Les cristaux ainsi formés sont plus réguliers et n'ont pas de surfaces incurvées comme ceux contrôlés par les *vésicules* (Lowenstam et Weiner, 1989).

Dans le modèle de la nacre, les cristaux aragonitiques se forment dans des compartiments préformés en 3D qui ont une forme de polygone (Bevelander et Nakahara, 1969a ; Nakahara, 1983). La taille de ces polygones est uniforme et s'agrandit avec la minéralisation. Leurs frontières peuvent être également contrôlées en fonction du nombre de cristaux voisins qu'ils touchent (Weiner, 1986). L'arrêt de croissance peut donc être un résultat du nombre de contacts avec d'autres cristaux.

Dans certaines structures sphérulitiques, la minéralisation s'arrête également quand les cristaux rentrent en contact avec des cristaux d'un site de nucléation voisin (Silyn-Robert et Sharp, 1986).

Par ailleurs, l'arrêt de la cristallisation peut également être dû au manque d'alimentation en ions sur les sites de minéralisation.

Le matériel organique de la coquille agit comme un moule dans lequel les cristaux croissent (Wada, 1961 ; Bevelander et Nakahara, 1969b). De plus, il contrôle la nature du polymorphe de carbonate de calcium et sa microstructure (cf. encarts verts). La matrice soluble dans l'EDTA, l'acide (acétique) ou l'eau, représente entre 0,03 et 0,5% de la masse totale du biominéral tandis que la matrice insoluble est évaluée entre 0,01 et 5%. Ces valeurs dépendent du type de microstructure et de l'espèce étudiée. En effet, la quantité de matrice organique est plus grande dans la nacre que dans les prismes, et que dans la structure lamellaire croisée. Lors de la formation de la coquille, la plus grande dépense énergétique consommée par l'organisme est pour produire cette matrice organique. Les variations de sa quantité sont interprétées comme une optimisation du rapport coût/profit mise en place au cours de l'évolution (Palmer, 1992).

L'existence de la *matrice soluble* n'a été découverte que récemment (Crenshaw, 1972b). La majeure partie de cette fraction soluble est composée par des protéines, des glycoprotéines portant souvent des sucres sulfatées, et des polysaccharides (Grégoire *et al.*, 1955 ; Simkiss, 1965 ; Crenshaw, 1972b ; Weiner et Hood, 1975 ; Weiner, 1979). Ces macromolécules poly-anioniques peuvent agir comme des supports de l'initiation de la

nucléation des cristaux de carbonate de calcium et comme des inhibiteurs de la précipitation des cristaux (cf. 2. 4. 4. 3.). La découverte de ces deux fonctions antagonistes, au sein de la matrice soluble a permis de faire émerger la notion de régulation de la minéralisation par la matrice organique (Wheeler et al., 1981).

Dans toutes les coquilles de mollusques, les protéines sont très riches en acides aspartiques et en acides glutamiques (Weiner, 1979 ; Nakahara *et al.*, 1982 ; Keith *et al.*, 1993 ; Sarashina et Endo, 1998). Les groupements carboxyles de ces résidus permettent à ces macromolécules de lier les ions calcium ou de nucléer la formation des cristaux de carbonate de calcium. De plus, les séquences d'acides aminés contenant des tronçons de résidus d'acide aspartique sont souvent séparées par des glycines ou des sérines (Weiner et Hood, 1975).

Les groupements sulfates des glycoprotéines et des polysaccharides semblent être également impliqués dans la capacité de la matrice à interagir avec le calcium (Addadi et al., 1987). Par exemple, une glycoprotéine purifiée de *Mytilus californianus* riche en acide aspartique (environ 30% molaire), et avec un poids moléculaire de 15 000 g/mol, ne contient pas moins de 70 sulfates pour 100 acides aminés (Addadi et al., 1987).

Les protéines solubles coquillières fixent le calcium (Crenshaw, 1972b ; Krampitz et al., 1983a ; Krampitz et al., 1983b) en utilisant leurs chaînes polypeptidiques organisées avec une conformation en feuillets β (encart 6) (Worms et Weiner, 1986).

La *matrice insoluble* est connue depuis plus d'un siècle et demi sous le nom de « conchioline » (Fremy, 1855). Les protéines qui la composent sont souvent hydrophobes (Crenshaw, 1982) et riches en glycine, ou en glycine et en alanine (Meenakshi *et al.*, 1971 ; Grégoire, 1972). Elles ont également des résidus aromatiques (Ravindranath et Rajeswari Ravindranath, 1974).

En 1955, Grégoire et al. avaient déjà découvert et isolé différents composés protéiques que sont la Nacrin, la Nacrosclerotin et la Nacroin. Ce dernier est particulièrement riche en résidus alanines et glycines (Grégoire *et al.*, 1955).

Par ailleurs, les protéines des fractions insolubles coquillières présentent une composition en acides aminés comparable à celle des protéines de type fibroïne de soie (Nakahara *et al.*, 1982 ; Keith *et al.*, 1993). Ce sont les principales protéines présentes dans la soie des papillons et des araignées. Cette similitude expliquerait l'élasticité importante de la coquille des mollusques et sa résistance à la fracture (Wise, 1970).

Chapitre 1

La fraction insoluble contient également une partie plus ou moins importante de chitine (Goffinet et Jeuniaux, 1979 ; Weiner et Traub, 1980 ; Levi-Kalisman *et al.*, 2001), dans sa forme β (Jeuniaux, 1963 ; Goffinet et Jeuniaux, 1969 ; Weiner et Traub, 1980 ; Crenshaw, 1982 ; Krampitz *et al.*, 1983a ; Weiner *et al.*, 1983b).

Dans la microstructure de la *nacre*, la matrice organique entoure individuellement chaque structure cristalline et peut être décomposée en différentes sous-couches (Bevelander et Nakahara, 1969b ; Levi-Kalisman *et al.*, 2001). Par exemple Nakahara a montré que les feuillets organiques des couches nacrées de gastéropodes sont composés d'au moins 5 différentes sous couches (Nakahara, 1979, 1983).

La figure 19b est un diagramme schématique de la structure de la matrice organique de la nacre d'*Atrina* créé par Levi-Kalisma et al. en 2001 à partir de leurs observations au cryo MEB et de résultats de la littérature. Cette figure montre que les feuillets interlamellaires sont principalement composés de β -chitine. De plus, les feuillets de surface denses aux électrons sont attribués à la présence de protéines riches en acides aspartiques. Ces feuillets seraient présents sous forme de plaques discontinues (Nakahara, 1983 ; Levi-Kalisman *et al.*, 2001). Enfin, la phase de gel constituée de protéines de types soies fibreuses est localisée entre ces feuillets (Bevelander et Nakahara, 1969b ; Weiner et Traub, 1980 ; Weiner *et al.*, 1983a ; Levi-Kalisman *et al.*, 2001). Les glycoprotéines acides intracristallines sont également présentes à l'intérieur des tablettes de nacre matures (Addadi *et al.*, 1991 ; Levi-Kalisman *et al.*, 2001). En effet, une fois la mise en place de la matrice organique, le gel de soies fibreuses serait remplacé par le minéral, les soies devenant ainsi reléguées aux espaces intra et intercristallins (encart 6). De plus, le complexe organique insoluble serait stabilisé avec des tannages quinone (encart 6) (Gordon et Carriker, 1980 ; Samata et al., 1980).

Toutes les matrices organiques de la nacre ne semblent pas contenir l'ensemble de ces couches organiques. En effet, la coquille large et robuste du gastéropode *Strombus gigas* contient seulement des couches acides (cf. 1. 4. 2. 2.) (Weiner, 1979 ; Bevelander et Nakahara, 1980). De plus, dans la couche nacrée du gastéropode *Turbo sp.*, le complexe protéique insoluble lié à la chitine n'est pas présent (Nakahara, 1979). Il ne semble donc pas être un composé essentiel. En opposition, la matrice acide et la couche de chitine seule sont toujours présentes dans la nacre (Poulicek et al., 1986). Par ailleurs, différents polysaccharides sulfatés ont été retrouvés autour et au centre des tablettes de nacre (Crenshaw et Ristedt, 1975).

Enfin, la matrice organique associée à la nacre contrôle la nucléation et l'orientation des axes cristallographiques (encarts 5 et 6).

Récemment, des observations à une échelle nanométrique au microscope à force atomique (AFM) ont montré que les cristaux de calcite et d'aragonite ont la même structure. Ils sont formés de nanograins cristallins séparés par une matrice organique probablement soluble (Blank et al., 2003 ; Dauphin, 2003 ; Rousseau et al., 2005b).

Dans les coquilles de mollusques, la matrice organique est principalement présente autour de chaque cristal mais également à l'intérieur même des cristaux (Crenshaw, 1972b). Comme ces macromolécules contrôlent la formation des couches minéralisées, elles se retrouvent intégrées de façon spécifique dans le minéral mature. La matrice insoluble est majoritairement péri-cristalline alors que la matrice soluble est plutôt intracristalline (Crenshaw, 1972b). Comme pour la formation des dents de chitons, la trame organique extracellulaire des coquilles est formée avant la formation des cristaux (cf. 2. 3. 4.) (Nakahara, 1979, 1983 ; Watabe, 1984).

Près de 60 *structures primaires* plus ou moins complètes des protéines coquillières de mollusques ont été décrites à ce jour (Marin et al., 2008). La première séquence partielle n'a été obtenue qu'au début des années 90 (Rusenko et al., 1991) et la première séquence complète n'a été décrite que 5 ans plus tard (Miyamoto et al., 1996).

Ces protéines sont souvent riches en acides aminés acides et peuvent comporter des modifications post-traductionnelles comme des glycosylations ou des phosphorylations (Marin et al., 2000 ; Sarashina et Endo, 2001). Elles ont des fonctions très diverses telles que des activités enzymatiques de type anhydrase carbonique (Miyamoto et al., 1996), une capacité à lier le calcium (Miyashita *et al.*, 2000 ; Marin *et al.*, 2005), une capacité à induire et à stabiliser spécifiquement un des polymorphes du carbonate de calcium (Belcher et al., 1996 ; Falini et al., 1996 ; Pokroy et al., 2006), une capacité à inhiber ou à induire la précipitation du carbonate de calcium (Kono et al., 2000 ; Marin et al., 2000 ; Weiss et al., 2001), et une capacité à se lier à une autre macromolécule (Shen *et al.*, 1997 ; Weiss *et al.*, 2000 ; Weiss *et al.*, 2001 ; Suzuki *et al.*, 2004). En 2008, Marin et al., ont décrit synthétiquement toutes ces protéines et les ont regroupées en fonction de leur point isoélectrique.

La composition de la matrice organique de la palourde n'est pas connue. La seule étude existante a été faite au niveau de la composition en acides aminés globaux (Goulettquer, 1989).

2. 4. 5. La zone entre le manteau et la coquille : l'espace extrapalléal

L'espace extrapalléal est très important pour comprendre les interactions entre le manteau et la coquille. Il est le lieu où s'effectue la transformation de la phase aqueuse sécrétée par l'épithélium externe du manteau, en phase solide minéralisée. Le fluide extrapalléal joue lui aussi plusieurs fonctions essentielles dans la formation des coquilles (Wilbur, 1964). C'est la solution mère saturée de la MBC (cf. 2. 4. 1.).

Chez quelques bivalves marins, la composition ionique du fluide extrapalléal est différente à la fois de l'hémolymphe et de l'eau environnante (Crenshaw, 1972a), car il est sursaturé en ions carbonates et calcium (cf. 2. 4. 1.) (Moura et al., 2000).

Le fluide extrapalléal est également riche en inhibiteurs de minéralisation afin d'éviter une formation non-contrôlée des cristaux de carbonate de calcium (Moura et al., 2000). Ce fluide extrapalléal contient également des accepteurs de protons émis par la réaction de calcification, afin d'éviter une acidification du milieu qui entraînerait la re-dissolution des minéraux (Marie, 2008).

L'espace extrapalléal est aussi la zone dans laquelle la matrice organique coquillière est sécrétée avant d'être incorporée au carbonate de calcium. Cependant, peu de macromolécules coquillières ont été observées au sein du fluide extrapalléal. Ces macromolécules transiteraient très rapidement à travers l'espace extrapalléal pour se lier au minéral en formation. De plus, certaines protéines qui ont été découvertes dans le fluide extrapalléal n'ont pas été retrouvées dans la coquille (Yin *et al.*, 2005 ; Ma *et al.*, 2007). Par exemple, dans le fluide extrapalléal du bivalve d'eau douce *Anodonta cygnea*, des polysaccharides acides spécifiques ont été observés mais pas dans la coquille (Moura et al., 2000).

De nombreux paramètres du fluide extra-palléal, que sont les concentrations en O₂, en calcium, en acide succinique, et le pH, dépendent de l'ouverture et de la fermeture des valves (Crenshaw et Neff, 1969).

Par ailleurs, quelques mollusques présentent un film organique fin et spécifique qui adhère fermement à la surface de la coquille au niveau de l'espace extrapalléal. Ce film a été observé chez les bivalves Arcoïdes à l'extérieur de la ligne palléale (Waller, 1980) et chez *Mercenaria mercenaria* et *Rangia cuneata* à l'intérieur de la ligne palléale (Neff, 1972 ; Marsh et Sass, 1983). Différentes particules sont associées à ce film. Chez la palourde estuarienne *R. cuneata*, la composition de ces particules varie avec la saison de la collecte. Certaines particules contiennent des phospholipides et du calcium qui sont également trouvés librement dans le fluide extra-palléal, ainsi que des particules riches en sulfate de baryum. La fonction de ce film et de ces particules n'est pas connue (Marsh, 1986).

Il reste beaucoup de choses à découvrir sur le transport des macromolécules et des ions à travers ce fluide extrapalléal, qui semble indispensable à la biominéralisation (Lowenstam et Weiner, 1989).

Encart P4 : L'espace et le fluide extrapalléal de la palourde japonaise

Chez la palourde japonaise, il existe 2 espaces délimités pour la biominéralisation. L'impression palléale sur la face interne de la coquille délimite les 2 espaces extrapalléaux. Au centre de la coquille se trouve l'espace extrapalléal central, et à l'extérieur l'espace extrapalléal périphérique (figures 16-17). L'espace extrapalléal central contient le fluide extrapalléal central. Il est limité par la coquille et le manteau. L'espace extrapalléal périphérique contient le fluide extrapalléal périphérique. Il est limité par la coquille, le bord du manteau et le périostracum. La couche coquillière externe prismatique est principalement formée par le fluide extrapalléal périphérique et la couche coquillière interne homogène par le fluide extrapalléal central (Allam et Paillard, 1998 ; Gosling, 2003).

2. 4. 6. La dissolution et le remodelage des coquilles

Les coquilles des mollusques ne sont pas des structures inertes dont la seule fonction est de protéger les tissus mous des animaux. En effet, chez les mollusques marins, d'eau douce et terrestres, les ions peuvent être transportés de la coquille vers l'hémolymphe ou les tissus (Collip, 1921 ; Dugal, 1939 ; Wagge, 1952 ; Greenaway, 1971). Ces organismes sont capables de dissoudre une partie de leur coquille en remobilisant différents ions qui peuvent être réintégrés dans le métabolisme de l'organisme. Ce phénomène les aide à supporter des conditions difficiles comme l'hypoxie du milieu ou une disette alimentaire hivernale (Greenaway, 1971 ; Lutz et Rhoads, 1977). La coquille est donc un réservoir d'ions calcium comme les os des vertébrés, même si elle est localisée à l'extérieur des tissus. Cette fonction de dissolution est associée à la respiration anaérobie des mollusques, notamment lorsque les

valves des bivalves sont fermées (Lutz et Rhoads, 1980). Le produit final de cette respiration est l'acide succinique, qui est tamponné par le carbonate de calcium de la coquille (Simpson et Awapara, 1966). C'est par exemple le cas du le bivalve marin *Mercenaria mercenaria* (Crenshaw et Neff, 1969).

Ce phénomène de dissolution/ remodelage existe aussi chez les gastéropodes. En effet, avant une période de croissance, l'opercule des gastéropodes est résorbé par dissolution. De plus, chez de nombreux *Conus sp.*, Cypréides et *Nerita sp.*, la paroi coquillière initialement formée est très amincie chez les animaux matures. Ce phénomène de remodelage est également présent chez certains gastéropodes terrestres, comme *Turbo sp.* chez qui les spirales précoces de leurs coquilles sont remplies avec du matériel coquillier additionnel.

La minéralisation des mollusques est très intéressante à étudier car ce processus est biologiquement contrôlé. De plus, la nacre et les dents de chitons et de patelles sont des modèles relativement simples et très bien étudiés, même à un niveau moléculaire. En opposition, il est presque impossible de décrire certains processus de minéralisation plus complexes. De plus, les processus de minéralisation sont très diversifiés dans ce phylum des mollusques et leurs contrôles sont très variés et très sophistiqués (Lowenstam et Weiner, 1989).

2. 5. *La réparation coquillière des mollusques*

Le sujet de cette thèse est de caractériser la réparation coquillière de la palourde japonaise suite à une infection par le *Vibrio tapetis* ; la bactérie responsable de la Maladie de l'Anneau Brun. Le phénomène de réparation coquillière a déjà été étudié chez de nombreux mollusques. Deux types de travaux ont été faits. Des études ont été effectuées sur des coquilles de mollusques ayant réparé suite à une intrusion de *corps étrangers* biotiques (par exemple le *V. tapetis*) ou abiotiques, ainsi que sur des coquilles *expérimentalement altérées* par les chercheurs.

2. 5. 1. La Réparation coquillières suite à une intrusion

Dans le milieu naturel, des corps étrangers abiotiques (par exemple du sable) ou biotique (par exemple des parasites ou des intrus : de la bactérie jusqu'au poisson) viennent parfois sur la face interne des coquilles de mollusques affectant ainsi la biominéralisation (Lyster Jameson, 1902 ; Cheng, 1967).

Ces mollusques sont capables de réparer leur coquille dans le but de poursuivre leur biominéralisation et de rendre leur coquille étanche à l'eau et aux agressions. Par exemple chez les bivalves, le processus général de recouvrement des corps étrangers par une couche coquillière de réparation a déjà été décrit après des attaques de parasites, de pathogènes, ou la présence d'intrus. Ces réparations ont pour conséquence la formation des perles naturelles ou des encapsulations naturelles comme lors du recouvrement du trématode *Gymnophallus margariferum* et du polychète *Polydora spp.* (Lyster Jameson, 1902 ; Cheng, 1967 ; Taylor et Strack, 2008). Cheng a nommé ce phénomène « nacrésation » chez les mollusques nacrés (formant de la nacre aragonitique) (Cheng, 1967 ; Malek et Cheng, 1974).

Ce mécanisme de réparation coquillière est très proche de celui de la formation des perles et des demi-perles d'aquaculture (Arnaud-Haond et al., 2007 ; Taylor et Strack, 2008).

2. 5. 1. 1. La formation des encapsulations naturelles

Les encapsulations ne sont pas des perles mais des protubérances sur la couche interne des coquilles. Elles se forment quand des objets ou des organismes marins sont piégés dans l'espace extrapalléal. Chez les huîtres perlières, ces intrus sont souvent les mêmes que ceux qui forment les perles. Les huîtres perlières les recouvrent alors d'une couche de coquille en augmentant leur taux naturel de croissance de la couche interne. Ces encapsulations permettent également la réparation des trous dans les coquilles qui peuvent être formés par des polychètes ou des éponges.

Dans le cas des huîtres perlières, le taux de formation de la nacre est augmenté. Parfois de telles réparations peuvent être parfaites et ne pas laisser de trace, mais souvent elles forment des protubérances larges de quelques centimètres et ont des formes irrégulières. Dans ce cas, les couches de nacre ressemblent à celles de la coquille et sont donc non concentriques et parallèles. Ces protubérances peuvent être commercialisées une fois sciées (figures 21, 23 a.) (Taylor et Strack, 2008).

Ces encapsulations de réparation sont fréquemment observées chez de nombreuses espèces de mollusques autres que les huîtres perlières. Par exemple, la palourde japonaise face à la maladie de l'anneau brun utilise une réparation de ce type. La différence est que l'épaisseur de la couche de conchioline est plus importante chez les palourdes que chez les huîtres perlières.

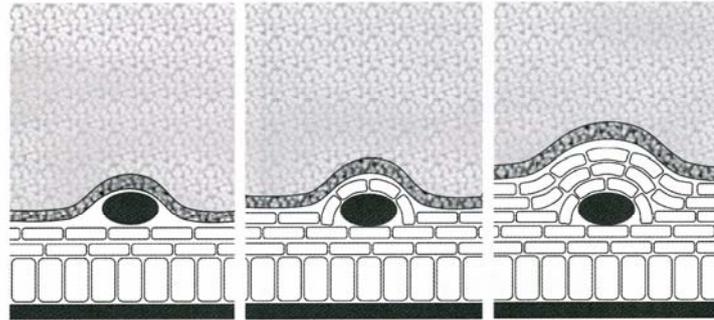


Figure 21 : Représentation schématique de la formation d'une encapsulation. Un corps étranger est piégé entre la coquille et le manteau (gauche) puis est couvert par des couches nacrées successives (milieu et droite), d'après (Strack, 2006 ; Taylor et Strack, 2008)

2. 5. 1. 2. La formation des perles naturelles

Cette formation est le résultat d'un évènement accidentel au cours du cycle de vie d'un mollusque. Une ou plusieurs cellules épithéliales de la couche supérieure du manteau (contre la coquille) sont transférées dans les tissus conjonctifs, où elles se multiplient par mitose et forment le sac perlier : un ciste clôt. Ce transfert peut avoir de nombreuses causes. La principale cause est une blessure du manteau notamment au niveau de l'épithélium supérieur. Ce transfert peut avoir lieu lorsque des intrus atteignent le fluide extrapalléal. Ces intrus peuvent être des petits gastéropodes, des petits crabes, des larves de cestodes, des copépodes parasitiques, des petits morceaux de coquille cassée et de conchioline, des petits cailloux, des grains de sable, mais aussi des ovocytes. En effet, toute substance résultant du propre métabolisme du mollusque non éjectée par les voies usuelles peut agir comme un intrus (Taylor et Strack, 2008).

Contrairement aux idées reçues, ces intrus sont très souvent expulsés du fluide extrapalléal avant la formation de la perle et ne sont donc généralement pas présents dans le sac perlier. En effet, les huîtres perlières ont un taux de ventilation de ce fluide dû aux mouvements du manteau plus élevé que chez tous les autres bivalves étudiés. C'est ainsi qu'elles expulsent les intrus. La présence d'un corps étranger n'est donc pas nécessaire pour former une perle, seule la blessure du manteau suffit. Cependant, les intrus sont parfois retrouvés dans les sacs perliers, notamment quand ils sont grands (Taylor et Strack, 2008). Une perle peut également être formée lorsque des cellules épithéliales se multiplient à haute vitesse et sans contrôle comme un « cancer » (Strack, 2006).

2. 5. 1. 3. La formation des perles d'aquaculture

Lors de la production de perles de cultures comme chez *Pinctada spp.*, une greffe de manteau venant d'un organisme donneur est implantée dans la gonade d'une huître receveuse. Au même endroit et au même moment, un petit nucléus rond et inorganique restant en contact avec la greffe est également implanté. Ensuite, autour du nucléus se développe un follicule appelé « sac perlier » suivi des différentes étapes de la biominéralisation (Arnaud-Haond et al., 2007 ; Taylor et Strack, 2008).

Les cellules du sac perlier produisent différentes sécrétions en fonction de leur âge. Les jeunes cellules produisent de la conchioline sous forme d'une structure lamellaire très fine. C'est la première structure formée lors de la formation d'une perle. Cette trame organique sert notamment au transport du calcium. Les cellules un peu plus âgées produisent ensuite une couche de calcite prismatique formée de cristaux fuselés, et dont les axes longitudinaux sont orientés vers le centre de la perle. Dans la dernière étape, les cellules forment la couche externe nacrée (aragonite). Le sac perlier croît avec la formation de la perle en formant de nouvelles cellules (Taylor et Strack, 2008). La structure nacrée de la perle est comparable à celle de la coquille. Elle est constituée de tablettes de nacre polygonales dont l'épaisseur moyenne est de 0.5 μm chez *Pinctada margaritifera*. Son taux de croissance dépend de celui de la coquille ainsi que de la période de l'année. L'arrangement des tablettes de nacre en surface de la perle fait penser à un pavage de carreaux hexagonaux (figure 22 a.). Chaque tablette de nacre est entourée par de la matrice organique. La structure de ces couches de tablettes forme en surface un relief ondulé (figure 22 b.). La structure spécifique de la surface de la perle a pour conséquence une augmentation de la réfraction et de la réflexion de la lumière (figure 22 c.). C'est ce phénomène qui donne l'iridescence et l'éclat aux perles (Taylor et Strack, 2008).

La structure des perles est similaire à celle de la coquille, sauf que sur une perle, la couche externe correspond à la couche interne de la coquille. De plus, les couches coquillières nacrées montrent une structure horizontale alors que celle de la perle est concentrique (figure 22) (Taylor et Strack, 2008).

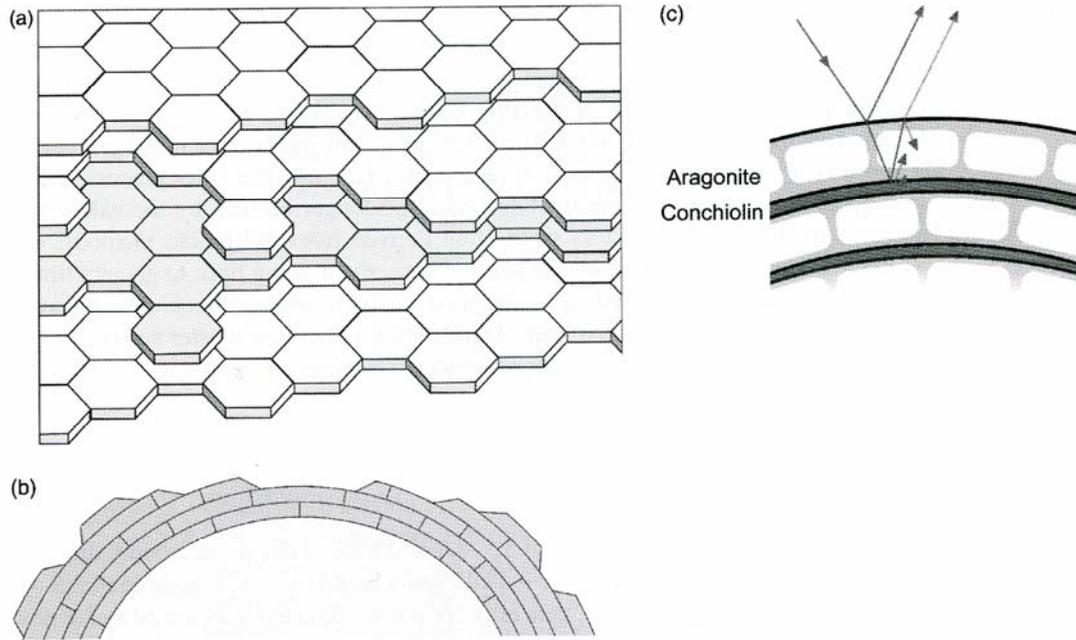


Figure 22 : Représentations schématiques (a) des tablettes aragonitiques entourées de matrice organique dans une perle, (b) d'une section à travers une couche externe nacrée d'une perle incomplète montrant son contours, (c) de la réfraction et la réflexion de la lumière à la surface d'une perle dues aux couches alternées d'aragonite et de conchioline, d'après (Strack, 2006 ; Taylor et Strack, 2008)

Les principales espèces de mollusques qui produisent des perles sont *Pinctada margaritifera*, *P. maxima*, *P. fucata* et *Strombus gigas* dans l'eau de mer, et *Hyriopsis sp* et *Margaritifera margaritifera* dans l'eau douce (Latzoura et Soladin, 2007).

2. 5. 1. 4. L'histoire de la perliculture

Depuis leur apparition il y a 530 millions d'années, les mollusques formaient probablement des perles. Les plus anciennes perles fossiles connues datent de 200 millions d'années. Elles sont très rares et proviennent principalement des bivalves marins et plus rarement des bivalves d'eau douce. La plus ancienne civilisation découverte récoltant des perles est la civilisation Jomon, vieille d'environ 5500 ans au Japon. Les perles furent également récoltées au 3^e millénaire avant J-C en Mésopotamie. Bien plus tard, le Golfe Persique fut le premier fournisseur au monde. Ces bancs naturels d'huîtres ont alors connu un déclin dû aux pollutions liées à l'essor du pétrole au Moyen-Orient. Un cri d'alarme a donc été poussé à la fin du XIX^e siècle. C'est ainsi que les recherches sur la reproduction des huîtres et sur le processus de formation des perles commencèrent (Latzoura et Soladin, 2007).

Chapitre 1

Les Chinois ont été les premiers à cultiver les perles il y a 1600 ans, en plaçant de minuscules figures de Bouddha dans des moules chinoises *Cristaria plicata* et en créant ainsi des demi-perles à son effigie. En 1740 en Suède, le naturaliste Carl von Linné produit les premières perles de culture sphériques. Au début du XX^e siècle, deux japonais Toisuhei Misu et Nishikawa ont adapté les techniques de perliculture pour la culture à grande échelle, en ajoutant un morceau de manteau au nucléus. Ensuite, le Japonais Kokichi Mikimoto récolta les premières perles de culture parfaitement rondes et blanches (Latzoura et Soladin, 2007).

Aujourd'hui, il existe de nombreuses fermes perlières dans le monde dont 1100 à Tahiti. Ces fermes perlières produisent 800 millions de perles par an dans le monde dont 90 % sont des perles de mollusques d'eau douce de Chine. Pour donner leurs plus belles perles, les huîtres perlières exigent un environnement parfaitement pur, exempt de pollution et riche en plancton. Les huîtres juvéniles sont élevées pendant 2 à 3 ans avant d'être greffées. Sur 1000 huîtres greffées, seules 700 gardent le nucléus après 30 à 40 jours. Les autres le rejettent ou ne survivent pas à l'opération. Le processus de formation de la perle commence alors. Certaines sont les proies de prédateurs. De ce fait, environ 500 perles sont ensuite récoltées dont seulement 50 à 75 % sont commercialisables (figure 23 b.). Seule une vingtaine de celles-ci sont dites « parfaites » en fonction de leur taille, leur peau, leur éclat et leur absence de cercle ou de piqûre (Latzoura et Soladin, 2007).

Depuis quelques années, des scientifiques recherchent les molécules actives présentes dans la nacre ainsi que leurs applications, notamment lors d'expériences d'implants de nacre comme biomatériau de régénération osseuse. Des applications thérapeutiques potentielles existent dans différents domaines : orthopédie (défauts squelettiques pathologiques ou traumatiques), ostéoporose, arthrose et dermatologie (traitement de dermatites, psoriasis, cicatrisation, lutte contre le vieillissement cutané) (Sud *et al.*, 2001 ; Rousseau *et al.*, 2003 ; Milet *et al.*, 2004 ; Duplat *et al.*, 2006 ; Latzoura et Soladin, 2007 ; Rousseau *et al.*, 2007).

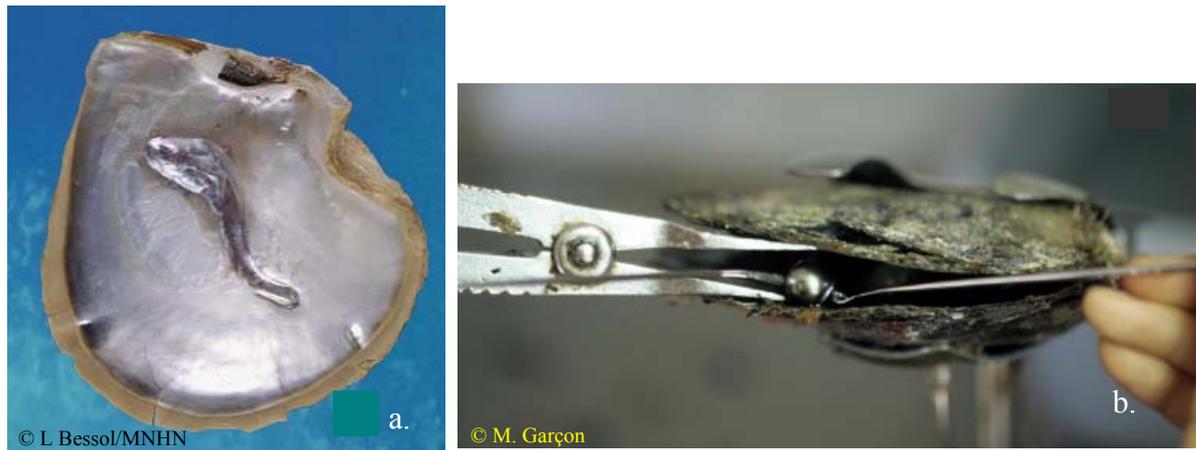


Figure 23 : a. Photo d'une coquille d'huître perlière *Pinctada mazatlanica* ayant recouvert un petit poisson de nacre sous forme d'une encapsulation naturelle, b. : Processus de récolte d'une perle chez *P. margaritifera* (Latzoura et Soladin, 2007)

2. 5. 2. La réparation coquillière suite à une fracture artificielle - comparaison avec une réparation parasitaire

Dans de but d'étudier les mécanismes de réparation coquillière, les coquilles de nombreux mollusques ont déjà été artificiellement altérées par des chercheurs. Ces expérimentations ont été faites sur les coquilles des gastéropodes *Haliotis tuberculata* (Fleury et al., 2008), *H. cracherodii* (Armstrong et al., 1971), *Helisoma duryi* (Wong et Saleuddin, 1972 ; Dillaman *et al.*, 1976), *Helix pomatia* (Abolins-Krogis, 1958, 1960, 1963b, a ; Saleuddin et Wilbur, 1969 ; Saleuddin, 1970, 1971 ; Ganagarajah et Saleuddin, 1972 ; Abolins-Krogis, 1976, 1979), *H. aspera* (Wagge, 1951), *Lymnaea stagnalis* (Timmermans, 1973), *Murex fulvescens* (Muzii et al., 1966), *Nautilus macrophalus* (Meenakshi et al., 1974b), *Oncomelania formosana* (Davis, 1964), *Pleurodonte sp.* (Andrews, 1934), *Euplecta indica* (Kapur et Sen Gupta, 1970), *Pomacea paludosa* (Meenakshi *et al.*, 1975 ; Blackwelder et Watabe, 1977 ; Watabe et Blackwelder, 1980) et des bivalves *Anodonta grandis* (Saleuddin, 1967), *A. cynea* et *A. anatina* (Beedham, 1965), *Crassostrea virginica* (Mount et al., 2004), *C. gigas* (DesVoignes et Sparks, 1968), *Mytilus edulis* (Meenakshi et al., 1973 ; Suzuki, 1979 ; Uozumi et Suzuki, 1979), *Pinctada margaritifera* (Caseiro et Gauthier, 1997, 1998) et *Ruditapes philippinarum* (Allam, 1998).

Ces expérimentations sont une première étape dans la compréhension de la réparation coquillière face aux altérations physiques observées dans le milieu naturel que sont : les trous dus aux collisions avec les roches et les altérations dues aux parasites comme les éponges, à la prédation, ou à la manipulation des mollusques d'élevage par les hommes. Une étude a permis

de comparer la réparation coquillière d'huîtres perlières *Pinctada margaritifera* trouées par un parasite : une éponge perforante, de celle des huîtres perlières trouées expérimentalement en laboratoire. Les mécanismes de ces deux réparations coquillières étaient très similaires au niveau ultrastructurel. La réparation commençait par la sécrétion d'une membrane organique qui permettait de fermer les trous, puis continuait par le dépôt de cristaux de nacre. La principale différence était que le manteau des coquilles trouées par les éponges devait se battre continuellement contre les parasites. La réparation apparaissait donc plus difficile et plus perturbée (Caseiro et Gauthier, 1998).

Le rôle des hémocytes dans la réparation coquillière a été étudié suite à des altérations expérimentales de coquilles de quelques espèces. Les hémocytes de mollusques sont particulièrement nombreux et actifs dans l'hémolymphe et dans les fluides extra-palléaux.

Chez *Pomacea paludosa*, 3 jours après l'ablation d'un morceau de coquille, les hémocytes se déplaçaient dans l'espace extra-palléal à travers les ouvertures causées par la dégénération des cellules épithéliales du manteau. Eventuellement, les hémocytes s'agrégeaient pour former une barrière de cellules. Dans le même temps, la formation des cristaux de calcite de réparation commençait. Sept jours après l'ablation, une apoptose des hémocytes était observée dans le fluide extra-palléal. Ensuite, les produits de leur dégradation ainsi que les autres débris du fluide ont servi à la fondation d'un matériel fibreux et de larges sphérulites aragonitiques. De plus, durant cette réparation coquillière, le calcium était en plus forte concentration dans l'espace intercellulaire et les hémocytes ne montraient pas une concentration de calcium plus forte que les cellules épithéliales (Blackwelder et Watabe, 1977 ; Watabe et Blackwelder, 1980). De plus chez *Mytilus edulis*, après une altération du périostracum, les hémocytes venaient également à travers l'épithélium, mais dans le but de participer à la production du périostracum régénéré (Dunachie, 1963). Chez *Anodonta grandis*, après une altération de la coquille, une importante accumulation d'hémocytes dans l'épaisseur du manteau altéré était observée. Ces cellules étaient probablement responsables de la régénération de la partie abimée du manteau (Saleuddin, 1967). En conclusion, dans ces 3 cas, les hémocytes apparaissent dans la région sub-épithéliale du manteau en réparation, mais leur rôle semble différent à chaque fois même si leur implication dans le transport du matériel minéral était suggérée.

Par ailleurs, Mount et al. avaient effectué des cassures dans des coquilles de *Crassostrea virginica*. Après 48 heures, des granulocytes de l'hémolymphe (une sous-classe

Chapitre 1

des hémocytes) contenaient des cristaux de carbonate de calcium. Leur quantité augmentait plus rapidement que dans les autres types d'hémocytes. Ces hémocytes relâchaient ensuite des cristaux de calcium au niveau du front de la biominéralisation. La surface de ces cristaux calcitiques (spectrométrie Raman) était très lisse et leurs arêtes très bien définies (MEB) (Mount et al., 2004).

Toutes ces études ont été faites à partir de mollusques dont la coquille a été percée mais rien n'est connu sur le rôle des hémocytes dans la biominéralisation des coquilles non altérées et notamment dans le transport de carbonate de calcium insoluble. Dans le but de mieux comprendre la réparation coquillière de la palourde japonaise face à la MAB, la présence du carbonate de calcium dans les hémocytes de ce bivalve a été étudiée durant cette thèse.

Comme lors de la formation des coquilles de mollusques non altérées, dans ces réparations naturelles et artificielles les macromolécules de la matrice organique jouent un grand rôle dans la biominéralisation, notamment lors de la formation d'une membrane organique avant la déposition du minéral ou d'une modification de l'activité de la phosphatase alcaline lors des réparations expérimentales (Andrews, 1934 ; Wagge, 1951 ; Abolins-Krogis, 1958, 1963b ; Davis, 1964 ; Beedham, 1965 ; Saleuddin, 1967 ; Kapur et Sen Gupta, 1970 ; Saleuddin, 1971 ; Ganagarajah et Saleuddin, 1972 ; Meenakshi *et al.*, 1973 ; Timmermans, 1973 ; Meenakshi *et al.*, 1975 ; Abolins-Krogis, 1976 ; Blackwelder et Watabe, 1977 ; Abolins-Krogis, 1979 ; Suzuki, 1979 ; Uozumi et Suzuki, 1979 ; Caseiro et Gauthier, 1997, 1998 ; Fleury *et al.*, 2008) et lors de la formation des perles (Jacobs et al., 2008 ; Marin et al., 2008).

3. La palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et les altérations coquillières liées à la maladie de l'anneau brun

3. 1. *Qu'est-ce qu'une palourde japonaise ?*

3. 1. 1. La classification taxonomique de la palourde japonaise

Il existe plusieurs espèces de palourdes dont deux en France : la palourde européenne autochtone *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) et la palourde japonaise : *R. philippinarum* (Adams et Reeves, 1850). Cette étude ne s'intéresse qu'à la palourde japonaise.

La classification phylogénétique des bivalves a été présentée dans la partie II.2. Le groupe des bivalves appelés également « lamellibranches », comprend actuellement environ 12 000 espèces (Lecointre et Le Guyader, 2001).

Dans la classification traditionnelle, la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeves, 1850) est un animal invertébré, de l'embranchement des mollusques et appartenant à la classe des bivalves (Linné, 1758). Elle a donc un corps mou et deux valves. C'est un bivalve hétérodonte (Neumayr, 1884) appartenant à l'ordre des *Veneroidea* (Adams et Adams, 1856), à la famille des *Veneridae* (Rafinesque, 1815) et au genre *Ruditapes* (Chiamenti, 1900).

La synonymie de cette espèce est présente dans le tableau 4.

Tableau 4 : Synonymie de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*, d'après (Parache, 1982 ; Laruelle, 1999) et (Clemam, MNHN)

<i>Ruditapes</i>	<i>philippinarum</i>
<i>Tapes</i>	<i>philippinarum</i>
	<i>semidecussatus</i>
	<i>denticulata</i>
	<i>indica</i>
	<i>grata</i>
	<i>quadriradiata</i>
	<i>violascens</i>
	<i>japonica</i>
<i>Venerupis</i>	<i>philippinarum</i>
	<i>japonica</i>
<i>Venus</i>	<i>semidecussatus</i>
	<i>semidecussata</i>
	<i>japonica</i>
<i>Amygdala</i>	<i>semidecussata</i>
	<i>philippinarum</i>
<i>Paphia</i>	<i>bifurcata</i>

3. 1. 2. L'origine géographique et la répartition de la palourde japonaise

La figure 24 représente l'aire de répartition de la palourde japonaise *R. philippinarum*. Cette espèce est originaire de l'Indopacifique. Elle est présente dans cet océan depuis le Pakistan (30°N, 65°E) jusqu'aux îles Kouriles (65°N, 150°E) (Ponurovsky et Yakovlev, 1992). Elle occupe également toute la zone nord de l'Atlantique et de la Méditerranée comprise entre les longitudes 30° W et 35° E et les latitudes 12 et 61°N (figure 24) (Paillard, 2004a). Dans un but de développement et de diversification aquacole, la palourde japonaise a été introduite pour la première fois aux îles Hawaii en 1929 (Yap, 1977), puis accidentellement en 1936 en Oregon et en Colombie britannique où des populations naturelles se sont installées (figure 24, côte nord-ouest des Etats-Unis) (Quayle, 1951 ; Bourne, 1982).

La palourde japonaise a ensuite été introduite pour l'exploitation aquacole en France entre 1972 et 1975, en Angleterre en 1980, en Espagne et en Italie en 1985, en Norvège en

1987, et récemment en Irlande en 1997 (Breber, 1985 ; Flassch et Leborgne, 1992 ; Paillard, 2004a). La principale raison de l'importation de cette espèce est sa performance de croissance supérieure à celle de la palourde européenne *R. decussatus*. Les géniteurs introduits en France et en Grande Bretagne pour la production aquacole sont issus de la côte ouest des Etats-Unis. L'origine des palourdes des autres pays européens est difficile à déterminer car les transferts de ce coquillage par les éclosoeurs et les producteurs de palourdes aquacoles appelés « vénériculteurs » sont très nombreux.

A partir de 1988, cette espèce s'est adaptée à son nouvel environnement et sa reproduction en milieu naturel à permis la colonisation de la majorité des baies de la côte atlantique française ainsi que la côte des autres pays européens où elle a été cultivée. Ainsi elle est présente sur la côte sud de l'Angleterre (Humphreys et al., 2007), la côte atlantique espagnole avec les rias, ainsi que les côtes méditerranéennes et adriatiques (Cesari et Pellizzato, 1990 ; Laruelle, 1999). Par ailleurs, des cultures expérimentales ont été menées ponctuellement dans quelques autres coins du globe : aux îles vierges (Caraïbes, Tahiti) (Ponurovsky et Yakovlev, 1992), en Russie en 1984-1985 (Ponurovsky, 2002), en Tunisie (Cesari et Pellizzato, 1990), en Belgique, en Israël (Ponurovsky et Yakovlev, 1992 ; Paillard, 2004a), en Norvège (Mortensen et Strand, 2000 ; Paillard et al., 2008), en Californie et au Maroc (Paillard, 2004a).

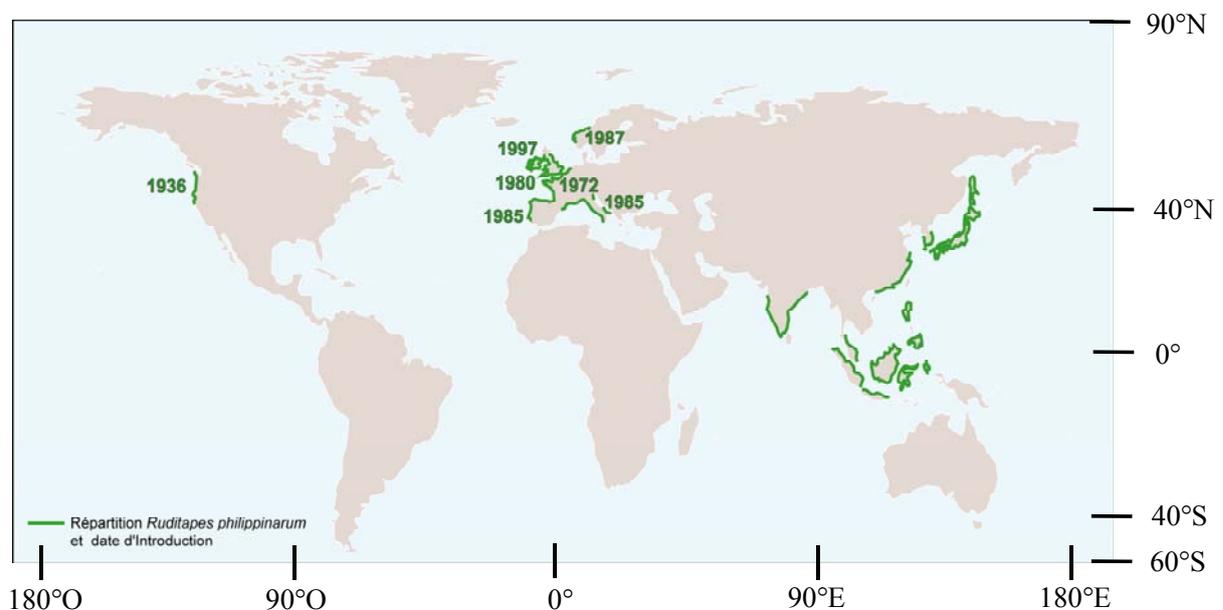


Figure 24 : Aire de répartition de la palourde *Ruditapes philippinarum* dans le monde et dates d'introduction, d'après (Paillard, 2004a)

La palourde japonaise est présente préférentiellement dans les baies et les estuaires peu profonds. Elle est capable de tolérer des dessalures complètes et temporaires, comme lorsque la mer se retire lors des grandes marées de vives eaux et qu'il pleut, ou bien qu'il y a des ruissellements d'eaux douces (Flye Sainte Marie, 2007).

La répartition bathymétrique de la palourde japonaise se situe à faible profondeur. En effet, ce bivalve vit dans les sédiments de l'estran, de 2,5 à 1 m au dessus de zéro des cartes, soit au niveau de la pleine mer des marées de vives eaux, jusqu'à quelques mètres de profondeur en zone subtidale. Il vit également dans les sédiments des lagunes et des claires (Quéro et Vayne, 1998 ; Flye Sainte Marie, 2007).

La tolérance de la palourde japonaise au niveau de sa répartition granulométrique est relativement grande car elle est présente dans des sédiments de types sable grossier, sable fin, gravier envasé et vase, ainsi que dans les herbiers de *Zostera noltii* (Flye Sainte Marie, 2007). La profondeur de son enfouissement est proportionnelle à sa taille. Elle dépend aussi des saisons et de l'oxygénation du sédiment. Elle atteint en moyenne 7 cm, mais peut aller jusqu'à 10 cm (Quéro et Vayne, 1998).

Cette espèce est très résistante aux variations des paramètres de l'environnement (t° , $S\%$, oxygénation et exondation) dans la mesure où elles ne sont ni trop fortes, ni durables. Cette espèce montre une aire de répartition thermique très étendue (figure 24) car elle a une gamme de tolérance thermique très large : de 10 à 30°C, même si la température optimale pour sa croissance est comprise entre 20 et 24°C. Par ailleurs, la salinité préférentielle de cette espèce est de l'ordre de 12 à 32 ‰ et le taux d'oxygène dissous ne doit pas être inférieur à 80% (Quéro et Vayne, 1998 ; Solidoro et al., 2000).

3. 1. 3. La production

Comme beaucoup d'autres bivalves tels que l'huître *Crassostrea gigas*, l'amande de mer *Glycymeris glycymeris*, la coquille Saint Jacques *Pecten maximus*, la praire *Venus verrucosa*, la moule *Mytilus edulis* et la palourde européenne *Ruditapes decussatus*, la palourde japonaise *R. philippinarum* est comestible et donc exploitée dans le milieu naturel ou en aquaculture ; appelée également « conchyliculture » : élevage de bivalves ou « vénériculture » : élevage de vénéridae. C'est l'une des espèces de bivalves les plus produites en aquaculture dans le monde. La forte valeur marchande de la palourde japonaise, ses performances de croissance, sa large tolérance en termes de sédiment, de salinité et de

température ont fait d'elle une espèce cible de la conchyliculture. La figure 25 représente l'évolution des tonnages mondiaux de palourdes japonaises capturées dans le milieu naturel ou produites par la vénériculture.

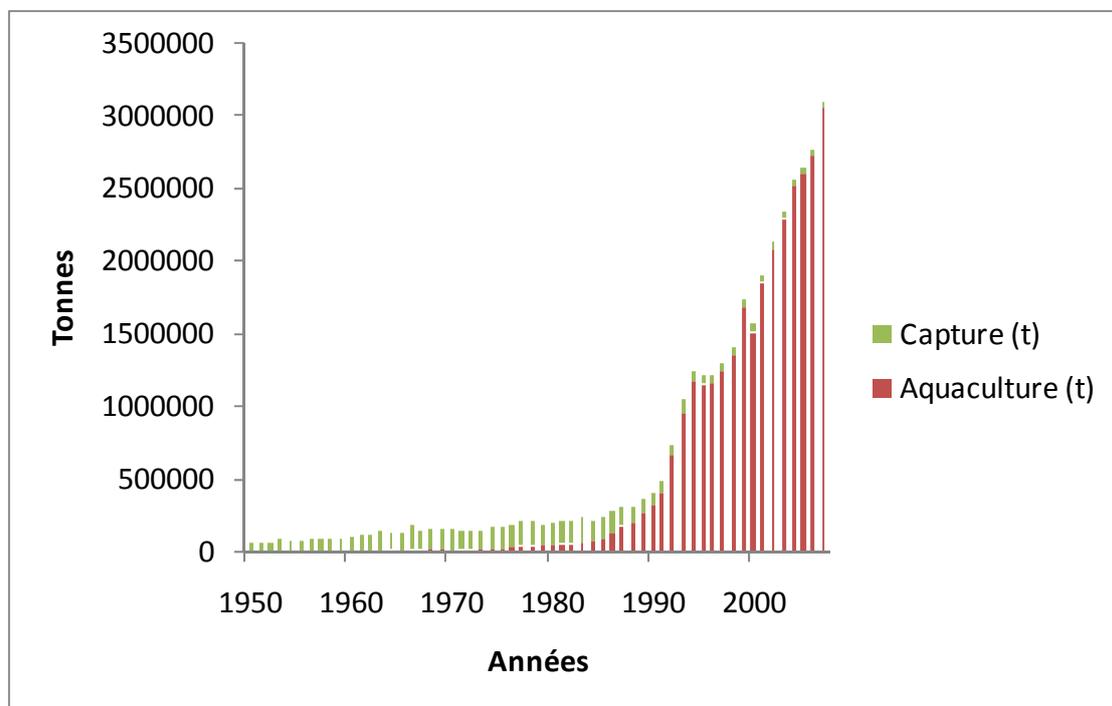


Figure 25 : Capture globale et production aquacole globale de *Ruditapes philippinarum* dans le monde (tonnes/ an) (FAO fisheries statistis www.fao.org)

En 2007, plus de 3 088 597 tonnes de palourdes ont été produites dans le monde par l'aquaculture (3 044 057 t soit 3 044 091 000 US\$) et la pêche (44 540 t). La production de palourdes japonaises par la conchyliculture a commencé à croître exponentiellement depuis environ 1985. C'est à ce même moment que sa capture globale a baissé (figure 25) (FAO fisheries statistis www.fao.org).

En comparaison, le tonnage mondial des palourdes (aquaculture et capture) est compris entre celui des huîtres et celui des moules. En effet, 4 268 411 tonnes d'huîtres *Crassostrea gigas*, 289 709 tonnes de moules *Mytilus edulis* et 52 480 tonnes de coquilles Saint Jaques *Pecten maximus* ont été produites en 2007 dans le monde (FAO fisheries statistis www.fao.org).

La palourde japonaise a donc un impact économique et social important pour les pays qui la cultivent. De plus, au niveau de sa valeur marchande, son prix au kilo est environ trois à quatre fois plus élevé que celui des moules et des huîtres (Goulletquer, 2006). La grande

Chapitre 1

majorité de la production de palourdes (aquaculture et capture) provient des pays asiatiques, avec la Chine qui assure 97.2 % de la production mondiale (2 957 346 tonnes de palourdes en 2007). Les autres plus grands pays producteurs (151 711 tonnes de palourdes sans la Chine) sont dans l'ordre décroissant l'Italie (61 724 t), le Japon (35 900 t), la Corée du Sud (27 459 t), les Etats-Unis (3 882 t), l'Espagne (1 250 t) et la France (540 t) (FAO fisheries statistics www.fao.org). Des problèmes de maladies comme la maladie de l'anneau brun ou la parasitose de *Perkinsus* affectent la production de certains pays comme la France ou la Corée du Sud (Gouilletquer, 2006). La production européenne représente environ 2,1 % (63 858 tonnes en 2007) de la production mondiale. Les pays leaders en Europe pour la production de palourdes sont l'Italie (96,7 %), l'Espagne (2,0 %) et la France (0,8 %) (FAO fisheries statistics www.fao.org).

Depuis 50 ans, la production mondiale de toutes les espèces de palourdes a augmenté d'un facteur 14,2 et la production européenne d'un facteur 6,6. Cette augmentation est principalement due à l'élevage extensif de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* en Chine. Au Japon, la production de palourdes issues de l'aquaculture est traditionnelle. En effet dès 1941, 64 766 tonnes provenaient déjà des cultures contre 41 377 tonnes de pêche (Cahn, 1951). Sur l'ensemble de la production de palourdes en Europe en 2007, 95 % sont assurés par l'aquaculture de la palourde japonaise *R. philippinarum* (FAO fisheries statistics www.fao.org).

L'introduction de la palourde japonaise en Europe et sa prolifération au sein des bancs de palourdes européennes, a transformé à grande échelle la structure des communautés benthiques et les activités de pêche côtière en Europe. Avant l'introduction de la palourde japonaise en Europe, la palourde européenne *R. decussatus* était pêchée le long de la façade atlantique européenne en utilisant principalement des pratiques traditionnelles. En effet, la distribution agrégative dans des milieux rocaillieux de cette espèce n'a jamais favorisé le développement d'une mécanisation importante. L'essentiel des *R. decussatus* était alors produit par l'Espagne, le Portugal et la France, notamment dans le Golfe du Morbihan et l'étang de Thau (1962-1972).

En 1972, la palourde japonaise a été introduite en France (Flassch et Leborgne, 1992). Dès les années 1980 en France, la conchyliculture de cette espèce prit son essor suite à la mise en place de protocoles de cultures en fermes aquacoles au niveau larvaire et du naissain (Lucas, 1976, 1977) et de projets régionaux et nationaux, notamment à Landéda, à l'île Tudy

Chapitre 1

et à Marennes Oléron (Flassch et al., 1992 ; Flassch et Leborgne, 1992). De tels essais d'aquaculture ont également été tentés dans le reste de l'Europe. Cependant la Maladie de l'Anneau Brun (MAB) est apparue et a enrayé cette production aquacole. En France, suite à cette maladie, la production de palourdes japonaises est passée de 500 tonnes en 1987 à 200 tonnes en 1989, dont plus de la moitié venait de la région des abers (Landéda, Nord Finistère) (figure 26). Des populations naturelles de palourdes japonaises se sont ensuite installées vers 1989-1990 dans certaines vasières du littoral atlantique comme le Golfe du Morbihan, la baie d'Arcachon (Robert et Deltreil, 1990) et Marennes Oléron (Gouletquer, 1989). En 1990, le tonnage pêché du golfe du Morbihan était d'environ 3000 tonnes. Il était alors l'un des sites les plus productifs français alors que les premières colonies naturelles avaient été répertoriées par des chercheurs de la station biologique de Bailleron seulement six années plus tôt, en 1984 (Le Pennec, 1999).

Depuis la fin des années 1990, la vénériculture s'est réimplantée dans certains sites comme celui des Iles Chausey, où la maladie de l'anneau brun se développe très peu et où la mécanisation de l'élevage est possible, assurant ainsi une bonne rentabilité.



Figure 26 : Récolte mécanique de palourdes japonaises à Landéda, Bouënnou, par le conchyliculteur Charles Avelines (photo C. Levasseur)

3. 1. 4. La biologie et l'écologie de la palourde japonaise

3. 1. 4. 1. **L'anatomie, la physiologie et l'alimentation**

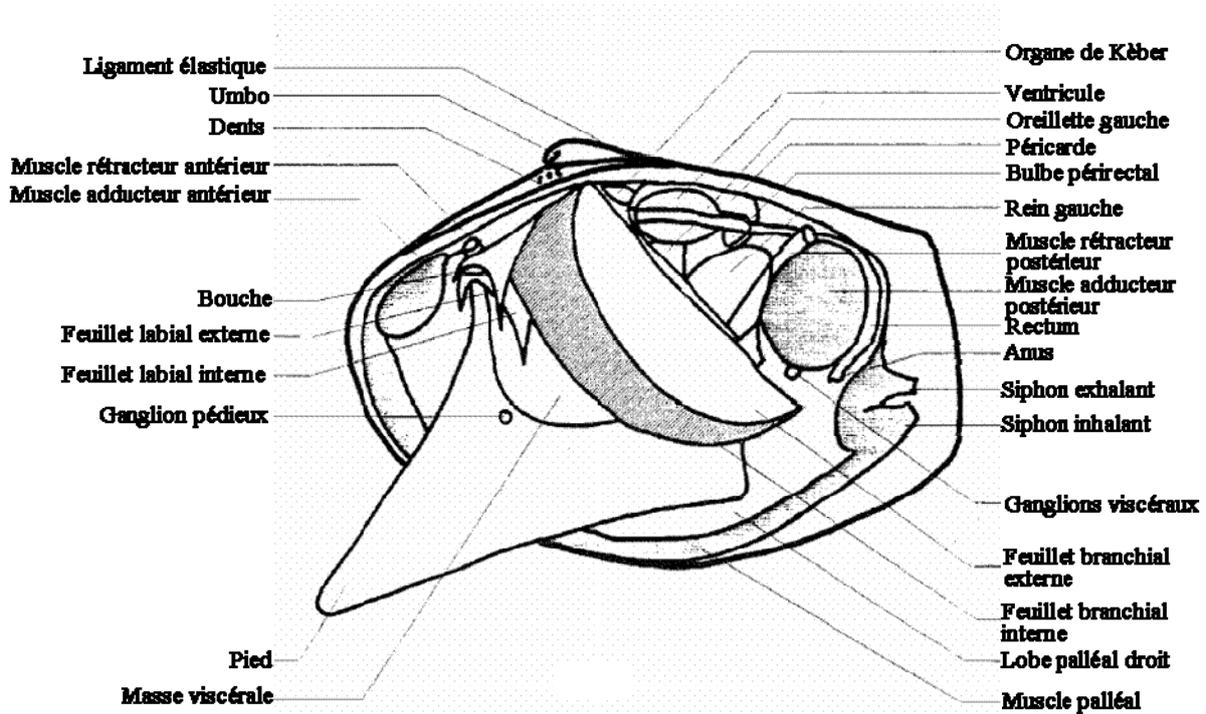


Figure 27 : Anatomie interne d'une palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*, dont la valve gauche est retirée (TP L2 UBO)

Comme tous les mollusques, les palourdes japonaises sont des métazoaires triploblastiques coelomates comprimés latéralement et qui ont gardé leur symétrie bilatérale. Le coelome est très réduit chez les adultes. Son corps ne présente pas de segmentation.

La palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* est un bivalve suspensivore. Elle est fouisseuse et endogée. En effet, elle vit enfuie à quelques centimètres dans le sédiment et présente deux siphons jointifs assez grands (un inhalant, un exhalant) ne se séparant qu'à quelques millimètres de leurs extrémités (figure 27). Cette caractéristique permet de différencier de façon fiable cette espèce de la palourde européenne *R. decussatus* (Quéro et Vayne, 1998 ; Flye Sainte Marie, 2007). L'eau nécessaire à sa nutrition est filtrée au niveau de l'interface eau-sédiment par ces siphons. La palourde japonaise se nourrit principalement de phytoplanctons, de microphytobenthos et de matières organiques particulières et détritiques (Flye Sainte Marie et al., 2007). Cette nourriture est apportée par le courant d'eau créé par le siphon inhalant et par les battements de cils des branchies (figure 27). L'eau chargée de ses particules en suspension arrive dans la cavité palléale, puis est filtrée par les branchies qui ont

Chapitre 1

une forme de feuillets. Celles-ci trient les particules, les agglutinent puis les transportent jusqu'aux palpes labiaux grâce à l'activité mucociliaire (Quéro et Vayne, 1998). Elles assurent également la réparation. L'eau ainsi que les déchets sortent ensuite par le siphon exhalant. Comme chez tous les bivalves, le tube digestif de la palourde japonaise est assez simple et traverse le cœur au niveau de l'intestin. De plus, la bouche est entourée de 4 palpes labiaux ciliés. L'estomac contient un long caecum postérieur dans lequel se trouve le stylet cristallin et deux glandes digestives. Cet estomac est lié à l'hépatopancréas (Lecointre et Le Guyader, 2001).

Le pied extensible est souvent musculeux et peut avoir plusieurs fonctions comme le déplacement. Deux muscles rétracteurs le relient au manteau. Dans cet organe se trouve la glande byssogène ainsi que l'organe d'équilibration. Les gonades sont présentes dans la masse viscérale, qui est en position dorsale par rapport au pied et qui sort ventralement des valves (Lecointre et Le Guyader, 2001).

Le manteau a été décrit dans la partie 2. 4. 2. (encart P1) Par ailleurs, les muscles adducteurs assurent la fermeture de la coquille lorsqu'ils se contractent (Lecointre et Le Guyader, 2001).

Le système circulatoire est semi-fermé et comprend des vaisseaux et des sinus. La circulation de l'hémolymphe dans ces structures est assurée par un cœur dorsal. Le péricarde entoure le cœur. Ce cœur est formé de 2 oreillettes et d'un ventricule propulsant l'hémolymphe dans 2 aortes (Lecointre et Le Guyader, 2001).

Le système néphrétique est composé de 2 reins qui débouchent dans le péricarde. L'« organe de Kèber », appelée également « glande périrectale », a été décrite par Kèber en 1851. Il intervient dans la filtration et l'épuration du sang lors de son transit par le cœur. La cavité palléale est délimitée par le manteau. Elle est ouverte sur l'extérieur et les systèmes excréteurs et reproducteurs, ainsi que l'anus y débouchent (Lecointre et Le Guyader, 2001 ; Auffret, 2003).

Le système nerveux des mollusques est composé d'un anneau entourant l'œsophage, de plusieurs paires de ganglions, d'une paire de cordons innervant le pied et d'une boucle palléale innervant le manteau et la masse viscérale. Il présente un degré moyen de fusion ganglionnaire (Lecointre et Le Guyader, 2001).

3. 1. 4. 2. La reproduction et le cycle de vie

R. philippinarum est une espèce strictement gonochorique qui a une fécondation externe. Comme chez la plupart des *Veneridae*, ses gonades forment un tissu diffus à l'intérieur de la masse viscérale, autour du système digestif (figure 27) (Gouletquer, 2006). Sa période de reproduction varie en fonction des aires géographiques (Devauchelle, 1990 ; Gouletquer, 2006). Les palourdes sont matures dès l'âge de 2 ans, soit quand elles mesurent 20 mm et même parfois 15 mm quand les conditions sont favorables (Quéro et Vayne, 1998 ; Laruelle, 1999 ; Flye Sainte Marie, 2007).

La température et la nourriture sont les deux paramètres principaux influençant la gamétogénèse qui peut être initiée à 8-12°C (Mann, 1979 ; Laruelle *et al.*, 1994 ; Laruelle, 1999 ; Ngo et Choi, 2004 ; Park et Choi, 2004 ; Gouletquer, 2006) et s'accélère avec la hausse de température estivale de l'eau de mer. La durée de la gamétogénèse baisse de 5 à 2 mois quand la température passe de 14 à 24°C (Devauchelle, 1990 ; Laruelle, 1999 ; Gouletquer, 2006). La palourde japonaise peut pondre dans cet écart de température, même si sa température optimale est située entre 20 et 22°C. La température de 12°C est le minimum en dessous duquel cette espèce ne peut pas pondre efficacement. Cependant, il existe des exceptions dans les eaux froides (Drummond *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'abondance de la nourriture influence la quantité de gamètes produites (Gouletquer, 2006). En aquaculture, les géniteurs ont au moins trois ans et présentent un bon état physiologique. Ils sont conditionnés avec une nourriture intense. La ponte est provoquée par une stimulation thermique. En général, les géniteurs femelles émettent leurs gamètes avant les males (Quéro et Vayne, 1998).

Sur la côte atlantique française, la ponte principale a lieu entre fin août et début septembre (Gouletquer, 1989 ; Robert *et al.*, 1993 ; Laruelle, 1999). Dans cette période, l'ensemble des individus de la population pondent de façon synchrone. En fonction des conditions environnementales, plusieurs pontes "partielles" peuvent également avoir lieu entre fin mai et fin août (Laruelle, 1999 ; Calvez, 2003). Ces pontes ont lieu de façon asynchrone (Laruelle, 1999 ; Calvez, 2003) et semblent être inefficaces en terme de recrutement (Calvez, 2003). Au cours de l'automne (vers début octobre), une ponte tardive est parfois observée si les conditions physiologiques et environnementales sont propices, particulièrement quand la taille des palourdes est supérieure à 35 mm (Quéro et Vayne, 1998 ; Gouletquer, 2006).

Enfin, une période de repos sexuel est observée entre la fin de l'automne et le début de l'hiver (Gouilletquer, 2006).

Comme la plupart des bivalves marins, la palourde japonaise est une espèce à cycle méroplanctonique. Ses gamètes sont émis dans la masse d'eau où se produisent la fécondation des ovocytes et le développement larvaire. Les œufs fécondés mesurent 70 µm de diamètre (Pronnier, 1996). Comme tous les bivalves, les œufs de palourdes suivent une segmentation spiralée. Les premières divisions sont très inégales. De ce fait, après 2 divisions, une des 4 cellules est plus grosse, c'est la cellule D. Cette cellule D se divise ensuite en cellules (micromère 2d) qui formeront la coquille (Marin et al., 2008).

Au bout de 24 à 48 heures, l'œuf se transforme en une larve nageante et ciliée caractéristique appelée la « larve-D » ou la « *larve trochophore ciliée* ». Elle commence alors à se nourrir de phytoplancton (figure 28) (Helm et Pelizzato, 1990 ; Jones et Sanford, 1993 ; Lecointre et Le Guyader, 2001 ; Calvez, 2003). La phase de vie larvaire planctonique dure de 10 à 15 jours (Jones et Sanford, 1993 ; Calvez, 2003), voire même 4 semaines (Gouilletquer, 2006). Pendant cette période, les larves sont dispersées de façon passive dans la masse d'eau (Calvez, 2003). La coquille a une origine ectodermique et les premières étapes de sa formation se déroulent pendant la phase trochophore (Le Penec, 1978). Elle est produite par un groupe de cellules localisées sur la face postérieure des larves. Ces cellules définissent un « domaine coquillier » (Kniprath, 1981). Ce domaine coquillier est différencié à la fin du stade de gastrulation, soit lors de l'épaississement de la partie médiane de l'ectoderme dans la région dorsale post-trocale (Moor, 1983). Ensuite, les cellules du domaine coquillier s'invaginent (Kniprath, 1981) afin de produire la « glande coquillière transitoire » ou « glande préconchylienne ». L'invagination est une étape nécessaire pour permettre aux cellules présentes à la périphérie de la glande coquillière (cellules non internalisées durant l'invagination) de produire la membrane organique primaire. Cette membrane sera le premier support lors de la déposition des minéraux de carbonate de calcium et se transformera en périostracum. Dans l'étape suivante, la glande coquillière s'aplatit graduellement et/ou s'invagine. Puis suite à des divisions mitotiques, elle s'étend. Dans le même temps, elle se transforme en épithélium du manteau larvaire. Parallèlement, le périostracum primaire se développe (Marin et al., 2008). La biominéralisation primaire prend alors place entre ce périostracum et le domaine coquillier. La première coquille est donc sécrétée durant le stade trochophore et est appelée « prodissoconche I ». Elle est caractérisée par son aspect granulaire (Mao Che et al., 2001).

Comme pour tous les bivalves, le développement post embryonnaire de la palourde japonaise est indirect (Martoja, 1995). Il est caractérisé par la transformation de la « larve trochophore ciliée » en « *larve véligère* », et par la métamorphose de cette larve véligère en un juvénile. Lors de la première transformation, les larves acquièrent un vélum afin de pouvoir nager, d'où le nom « larve véligère ». Pendant cette transformation, une coquille « prodissoconche II » est sécrétée. Ceci marque un changement dans le régime sécrétoire. Ce stade est caractérisé par l'apparition des stries de croissance sur les valves. C'est pourquoi il semblerait que les cellules qui sécrètent la coquille « prodissoconche I » soient différentes de celles qui sécrètent la coquille « prodissoconche II » (Le Pennec, 1978 ; Mao Che et al., 2001).

Ensuite, les larves de palourdes japonaises passent au « *stade pédivéligère* » ou « juvénile » (200 µm), lors duquel elles sédimentent de façon passive et se fixent au substrat. Elles passent alors à un mode de vie benthique (figure 28) (Jones et Sanford, 1993 ; Marin et al., 2008). Cette métamorphose est profonde. Elle correspond à la disparition du vélum, au développement du pied d'où le nom « stade pédivéligère », et à l'organisation de la glande digestive et des organes reproducteurs (Bonar, 1976). A ce stade, les coquilles mesurent entre 190 et 235 µm (Gouletquer, 2006). Durant ce stade larvaire, la coquille « dissoconche » est minéralisée (Le Pennec, 1978). Ce changement de sécrétion est marqué par une strie de croissance très marquée sur la coquille. Ces différentes étapes sur la formation de la coquille dans les stades larvaires sont depuis peu décrites aux niveaux enzymatiques et moléculaires chez les bivalves (Marin et al., 2008).

Beaucoup de facteurs environnementaux régulent le succès de la sédimentation de ces larves dans le milieu naturel comme la température, la salinité et les courants. Par ailleurs, le mouvement des larves dépend principalement des courants dynamiques et des marées (Gouletquer, 2006). Ces post-larves ont un processus de sélection active du substrat au cours de la fixation (Calvez, 2003). En effet, les densités les plus fortes de juvéniles (8 à 12 mm) sont souvent trouvées dans les zones sableuses par rapport aux zones vaseuses (Flye Sainte Marie, 2007). L'addition de graviers ronds et de petits cailloux peut faciliter le recrutement de cette espèce. En effet, la larve s'attache avec son byssus au fond, sur un caillou ou un morceau de coquille (Gouletquer, 2006).

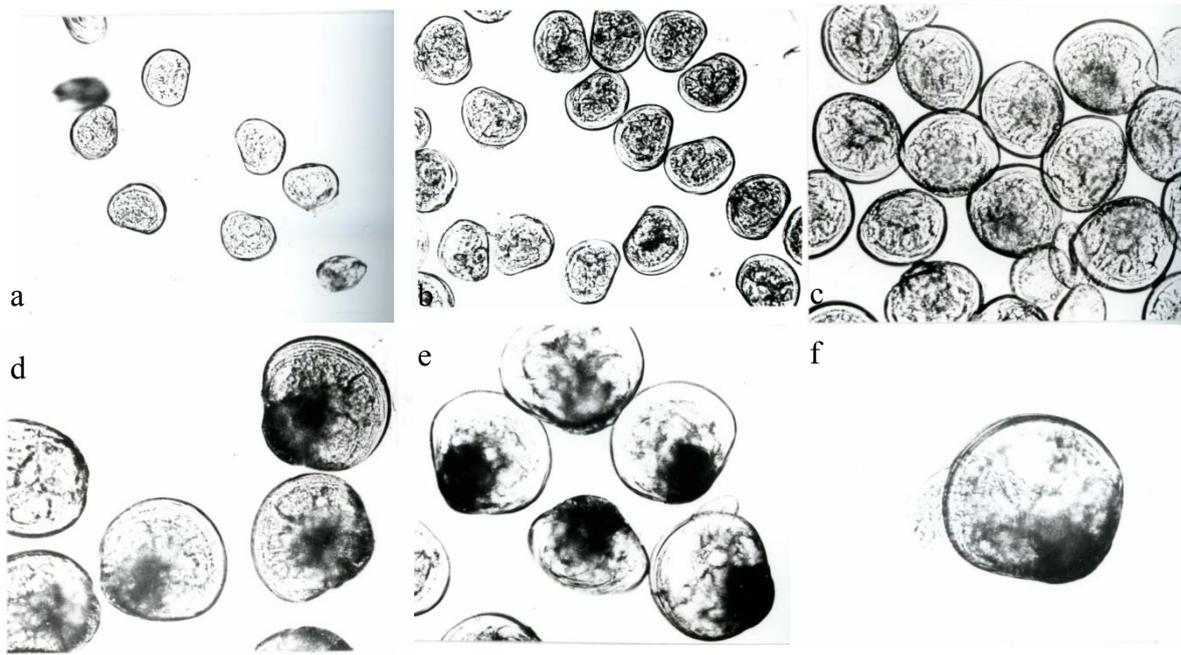


Figure 28 : Stades larvaires de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*, a. : Larves D, 100 μm x 80 μm , b. : Larves véligères de 8 jours, 120 μm x 100 μm , c. : Larves véligères à umbo proéminent, d. : Larves pédivéligères de 16 jours, 200 μm x 190 μm , e. : Jeunes dissoconques et f. : Dissoconques de 30 jours, 300 μm x 300 μm d'après (Le Pennec, 1978)

La taille commerciale de la palourde japonaise est de 35 mm. Les palourdes de cette taille issues de la vénériculture, ont environ un an et demi lorsqu'elles vivent en claires et un peu moins lorsqu'elles vivent sur l'estran (Quéro et Vayne, 1998). La longueur maximale estimée dans la littérature se situe entre 46 mm (Robert et al., 1993) et 67 mm (spécimen de Norvège) sur les côtes atlantiques françaises (Flye Sainte Marie, 2007 ; Paillard et al., 2008). Il semble donc que la taille maximale atteinte par *R. philippinarum* soit plutôt de l'ordre de 70 à 80 mm (Gosling, 2003 ; Flye Sainte Marie, 2007).

3. 2. *La biominéralisation de la palourde japonaise*

La biominéralisation de la palourde japonaise suit les mécanismes de formation des coquilles de bivalves, gastéropodes et céphalopodes (cf. 2. 4.). Il y a cependant quelques spécificités qui ont été décrites précédemment dans les encarts violets (P1-P4), notamment sur la morphologie du manteau, du périostracum et de la coquille, ainsi que sur la délimitation des espaces extrapalléaux de la palourde.

3. 3. *La Maladie de l'Anneau Brun (MAB) et ses altérations sur la biominéralisation de la palourde japonaise*

3. 3. 1. L'historique et la répartition

Entre le printemps et l'été 1987, des mortalités intensives de palourdes japonaises juvéniles et adultes ont été observées dans le bassin vénéricole des Abers sur le site de Landéda (nord Finistère), lequel était alors le premier site d'élevage de palourdes en France (500 tonnes en 1987) (Paillard et Maes, 1990 ; Flassch *et al.*, 1992). Ces mortalités étaient associées à un syndrome caractéristique : la présence d'un dépôt brun sur la périphérie de la face interne des valves (figure 30) (Paillard et Maes, 1990). Cette maladie a alors été nommée « la Maladie de l'Anneau Brun » (MAB). En 1989, Christine Paillard et Philippe Maes ont découvert l'agent étiologique responsable de cette maladie : une bactérie nommée *Vibrio tapetis* (Paillard et Maes, 1990 ; Borrego *et al.*, 1996).

Les bactéries du genre *Vibrio sp.* sont bien connues pour être la cause de pathologies chez de nombreux organismes, notamment chez l'homme. Par exemple, *V. cholerae* induit le cholera : une maladie infectieuse épidémique caractérisée par des diarrhées brutales et très abondantes (Colwell, 2004), *V. parahaemolyticus* est responsable de gastroentérites liées à la consommation de coquillages (comme les huîtres), de crustacés (comme les crabes) et de poissons crus (Makino *et al.*, 2003), et *V. vulnificus* cause des infections sévères suite à des blessures ou à l'ingestion de fruits de mer contaminés, pouvant entraîner la mort des individus sensibles en 24 à 48h (Johnston et Brown, 2002).

Ce genre présente également de nombreux pathogènes chez les organismes marins. Par exemple, *V. anguillarum* et *V. salmonida* affectent plus d'une cinquantaine de poissons dont l'anguille *Anguilla anguilla* et les saumons du Pacifique et de l'Atlantique *Oncorhynchus sp.* et *Salmo solar* (Thompson *et al.*, 2004 ; Lopez et Crosa, 2007). Un autre exemple est le blanchiment des coraux, une maladie caractérisée par la perte du symbiote algale photosynthétique de type zooxanthelle et qui est associée au réchauffement climatique. Cette maladie aurait été associée à des bactéries pathogènes que sont *V. coralliilyticus* en mer Rouge et *V. shiloi* en mer Méditerranée (Banin *et al.*, 2003 ; Ben-Haim *et al.*, 2003). Les crustacés comme les crevettes, sont également très affectés par des *Vibrios* comme *V. penaeicida*, *V. nigripulchritudo* et *V. harveyi* (Le Moullac *et al.*, 1997 ; Goarant *et al.*, 2000 ; Goarant et Merien, 2006). Les bivalves sont également touchés par ce genre, telles que les huîtres et avec *V. tubiashii*, *V. alginolyticus* et *V. anguillarum*, les myes avec *V. splendidus* et

V. aestuarianus et la coquille Saint Jacques avec *V. pectinica* (Lacoste *et al.*, 2001a ; Lacoste *et al.*, 2001b ; Waechter *et al.*, 2002 ; Paillard *et al.*, 2004b). Les ormeaux sont également très touchés comme *V. alginolyticus* chez *Haliotis rufescens* (Anguiano *et al.*, 1998) et *V. harveyi* chez *H. tuberculata* (Nicolas *et al.*, 2002), *H. diversicolor supertexta* (Nishimori *et al.*, 1998) et *H. rubra* (Handlering *et al.*, 2005).

Jusqu'aux années 1980, les maladies décrites chez les bivalves étaient principalement causées par des protozoaires comme *Bonamia spp.*, *Marteilia spp.* et *Perkinsus spp.* et des virus (Lauckner, 1983 ; Sinderman, 1990). Les premières maladies d'origine bactérienne connues ont été décrites chez les larves d'élevage. Elles provoquaient alors d'importantes mortalités (Lauckner, 1983 ; Sparks, 1985 ; Sinderman, 1990 ; Bower *et al.*, 1994 ; McGladdery, 1999 ; Paillard *et al.*, 2004b). Par la suite, trois maladies d'origine bactérienne affectant des bivalves adultes et juvéniles ont été décrites et leurs étiologies ont été totalement démontrées. Elles sont (1) la nocardiose chez l'huître du pacifique *Crassostrea gigas* (Friedman *et al.*, 1991 ; Friedman et Hedrick, 1991), (2) la Maladie de l'Anneau Brun (MAB) chez les palourdes *Ruditapes philippinarum* et *R. decussatus* (Paillard *et al.*, 1989 ; Paillard et Maes, 1990) et (3) la maladie des juvéniles d'huîtres *Crassostrea virginica*, « Juvenile Oyster Disease (JOD) » (Bricelj *et al.*, 1992 ; Paillard *et al.*, 1996 ; Boettcher *et al.*, 1999, 2000 ; Ford et Borrero, 2001). La MAB a été la première maladie bactérienne affectant un bivalve adulte décrite en Europe. Depuis lors, d'autres pathologies dont l'origine bactérienne a été suspectée, ont été décrites. C'est par exemple le cas des anomalies de calcification de type anneau brun rencontrées chez deux espèces d'huîtres perlières *Pinctada maxima* et *P. margaritifera* (Pass *et al.*, 1987 ; Marin et Dauphin, 1991), et du phénomène de mortalités estivales chez l'huître *Crassostrea gigas* associé au *Vibrio splendidus* (Lacoste *et al.*, 2001a ; Lacoste *et al.*, 2001b ; Waechter *et al.*, 2002) et au *V. aestuarianus* (Labreuche *et al.*, 2006a ; Labreuche *et al.*, 2006b).

La MAB a complètement décimé les cultures de palourdes en Bretagne. Aujourd'hui, la prévalence de la MAB est restée à un haut niveau sur le site de Landéda, c'est pourquoi la culture de palourdes n'a toujours pas été restaurée sur ce site (Paillard, 2004b).

Depuis 1987, la MAB s'est étendue le long des côtes françaises. Les symptômes (anneaux bruns) associés à d'importantes mortalités ont été rapidement signalés tout au long du littoral atlantique français. En effet, ils ont été signalés en 1988 dans le bassin de Marennes

Oléron (Gouletquer, 1989) et en 1989 dans le bassin d'Arcachon (figure 29) (Robert et Deltreil, 1990).

La MAB chez les palourdes japonaises s'est également étendue le long de la façade Atlantique de toute l'Europe, et plus rarement dans les mers Méditerranéenne et Adriatique, à cause des transferts de palourdes pour l'aquaculture. Le symptôme de la MAB a été détecté en Espagne en 1993, en Grande Bretagne en 1997, en Irlande en 1998, en Italie en 1990, en Tunisie en 2000, en Corée du Sud en 2003 et en Norvège en 2003 (figure 29) (Paillard, 2004a). Par ailleurs, la MAB n'a encore jamais été identifiée sur la côte ouest des Etats-Unis et du Canada, là où la palourde japonaise avait été initialement introduite en 1936.

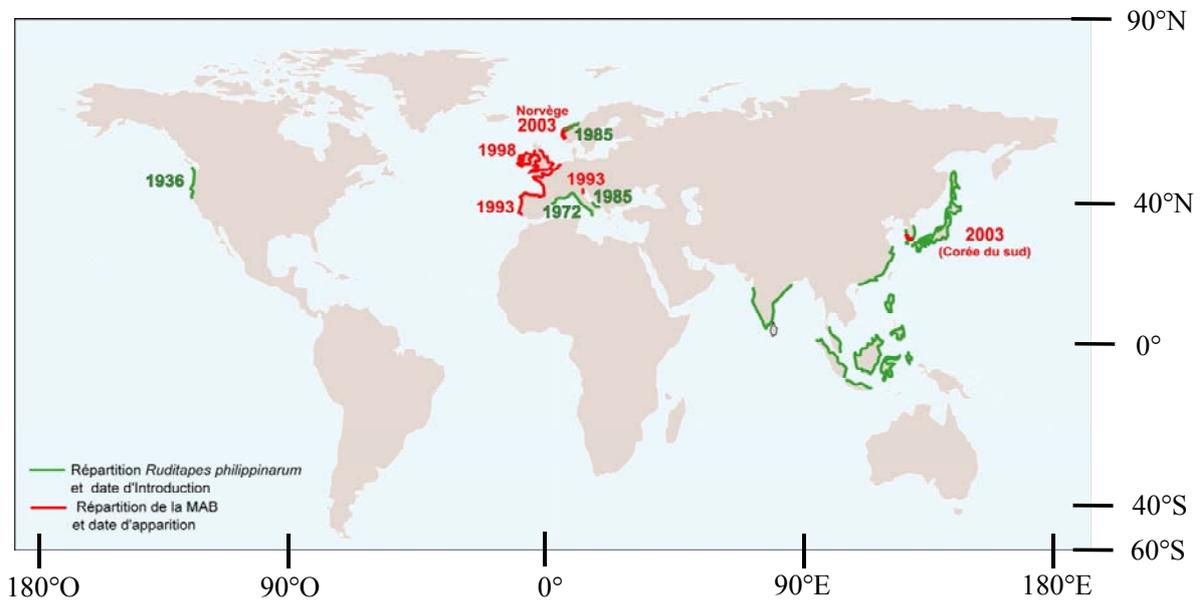


Figure 29 : Répartition de *Ruditapes philippinarum* en vert et de la Maladie de l'Anneau Brun en rouge, ainsi que ses dates d'apparition (Paillard, 2004a)

3. 3. 2. Le pathogène *Vibrio tapetis*

L'approche de l'étiologie qui a été menée pour identifier l'agent pathogène de la MAB a repris les principes des 4 postulats de Koch. Ils ont tous été prouvés.

La démarche a consisté en (1) la description des symptômes caractéristiques ou « pathogénèse », (2) la démonstration de la transmissibilité des symptômes caractéristiques, (3) la démonstration qu'une souche isolée à partir d'un individu malade est capable de reproduire expérimentalement le symptôme caractéristique sur des animaux sains et (4) la

Chapitre 1

détection de l'agent étiologique chez des animaux rendus malades expérimentalement et chez des individus malades provenant de sites géographiques différents (Paillard et Maes, 1990).

L'agent pathogène a été identifié en 1990 à Landéda (Nord Finistère, France). C'est une bactérie qui a été nommée *Vibrio* Prédominant 1 ou VP1 dans un premier temps, puis *Vibrio tapetis* (Paillard et Maes, 1990 ; Borrego *et al.*, 1996). Voici la position systématique de cette bactérie :

Phylum : *Proteobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1986)

Classe : *Gammaproteobacteria*

Ordre : *Vibrionales*

Famille : *Vibrionaceae* (Véron, 1965).

Depuis l'apparition de la maladie en 1987 à Landéda (Finistère nord, France), 34 souches de *V. tapetis* ou « variants » ont été isolées de la palourde japonaise, mais aussi d'autres bivalves et de poissons, et ce en différents lieux géographiques. En effet, des souches de *V. tapetis* ont été isolées un peu partout en Europe : France, Italie, Espagne (Castro *et al.*, 1992), Ecosse (Reid *et al.*, 2003a) et Norvège (Jensen *et al.*, 2003). Une partie importante de ces souches a été caractérisée au niveau phénotypique et génétique et leur pathogénicité a été confirmée *in vivo* (Paillard et Maes, 1990 ; Maes, 1992 ; Paillard, 1992 ; Choquet, 2004). Ces souches ont été principalement isolées de la palourde japonaise, mais aussi de la palourde européenne *R. decussatus*, de la palourde rose *Tapes rhomboïdes*, de la dosyne *Dosinia exoleta* (Le Chevalier *et al.*, Comm. Pers.), et des poissons : du flétan d'Atlantique *Hippoglossus hippoglossus* (Reid *et al.*, 2003a) et du crénilabre commun *Symphodus melops* (Jensen *et al.*, 2003).

Deux hypothèses existent pour expliquer l'émergence de cette maladie. Soit *V. tapetis* a été introduit en Europe en même temps que son hôte la palourde japonaise. Mais une souche apparentée au *V. tapetis* n'a été trouvée en Corée du Sud qu'en 2003 (Park *et al.*, 2006). Soit il a toujours été présent sur les côtes européennes, en tant que parasite de la palourde européenne *R. decussatus*. Il aurait co-évolué avec elle, puis aurait parasité la palourde japonaise introduite qui se serait mal adaptée à ce pathogène, provoquant ainsi une épizootie (Paillard, 2004a).

3. 3. 3. Le mécanisme de la MAB

La MAB est une maladie bactérienne affectant l'élaboration de la coquille chez la palourde japonaise.

3. 3. 3. 1. Les étapes de la colonisation

Dans un premier temps, le *Vibrio tapetis* entre dans la cavité palléale de la palourde japonaise ou dans ses siphons, puis se pose sur la surface externe du périostracum (figure 30 a.). Il colonise alors la périphérie de la couche interne de la coquille, le bord du manteau et le périostracum qu'il altère (figure 30 b.) (Paillard, 1992 ; Paillard et Le Penec, 1993 ; Paillard *et al.*, 1994 ; Paillard et Maes, 1995a, b). Dans le milieu naturel, l'infection commence majoritairement par la zone sinusale. Le *V. tapetis* adhère au périostracum en utilisant ses pilis puis induit des altérations au sein de cette couche organique. Le périostracum dégradé devient alors pigmenté avec une couleur brune. La lame périostracale montre alors des altérations typiques comme des couches organiques additionnelles riches en vacuoles et des débris cellulaires s'intercalant entre la couche de matrice fibreuse et le périostracum (Paillard et Maes, 1995a). Comme la lame périostracale est nécessaire à la biominéralisation (cf. 2. 4. 3.), un animal atteint de la MAB montre un ralentissement voire un arrêt de la croissance. En conséquence, des déformations de la coquille, comme des ondulations, sont souvent visibles localement sur le bord externe des valves (Paillard, 2004a).

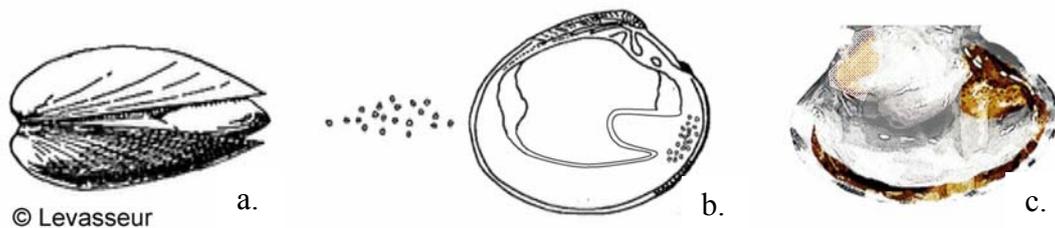


Figure 30 : Etapes de la formation du dépôt brun lors de la Maladie de l'Anneau Brun chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*. a. Entrée du *Vibrio tapetis* entre les valves de la palourde vers la cavité palléale, b. Colonisation du *V. tapetis* sur la couche interne de la coquille au niveau de la lame périostracale ; vue d'un animal vide, c. Apparition du dépôt brun sur la zone infectée ; vue d'un animal vide

3. 3. 3. 2. Les étapes de la formation de l'anneau brun

En plus de la dégradation du périostracum, la multiplication des bactéries au sein de la lame périostracale provoque chez l'hôte la production et l'accumulation d'une matrice organique coquillière brune appelée « conchioline » sur la face interne des valves, recouvrant ainsi la zone affectée par les bactéries (Paillard *et al.*, 1994 ; Paillard et Maes, 1995a, b). Cette conchioline est insoluble dans l'eau, dans les solutions salines et dans les solvants organiques (Fremy, 1855 ; Grégoire *et al.*, 1955). Cette matrice coquillière ainsi que les macromolécules du périostracum constituent un dépôt brun qui est souvent localisé entre la ligne palléale et le bord de la coquille (Paillard, 2004a). Elle forme ainsi un anneau brun, d'où le nom donné à cette maladie (figure 30 c.) (Paillard *et al.*, 1989). Ce dépôt brun présente une composition biochimique différente de la matrice coquillière saine (Goulletquer, 1989). Dans les premiers stades de formation, ce dépôt peut être microscopique. Il est alors soit sous forme de petites taches brunes, soit sous forme d'un film organique constitué de quelques lamelles de coloration brun clair (Paillard, 2004a). Puis ce dépôt brun devient plus épais et apparaît au MEB comme très organique (Paillard et Maes, 1995a, b) et colonisé parfois par des proliférations bactériennes (Paillard *et al.*, 1994 ; Paillard et Maes, 1995b). Il est alors constitué de nombreuses lamelles organiques empilées, qui lui confèrent une structure feuilletée. Par ailleurs, plus il est épais, plus sa coloration est brune.

Quand le dépôt est très épais, le bourrelet externe du bord du manteau a souvent un aspect boursoufflé, signe externe de lésions telles que la desquamation ou l'hypertrophie de l'épithélium palléal (Paillard, 1992).

Cet anneau brun provient d'une part de la dégradation de la lame périostracale et d'autre part d'une matrice organique appelée « conchioline » et sécrétée par la palourde pour se défendre.

Le processus de défense "externe" de la palourde japonaise peut être décomposé en deux étapes. La première consiste en l'enrobage des bactéries par des couches de périostracum et de conchioline. Le deuxième mécanisme est le recouvrement de ce dépôt organique par des couches coquillières (cf. 3. 4.) (Paillard *et al.*, 1994). Les enzymes et les molécules impliquées dans la cascade phenoloxydase (enzymes et mélanine) interviendraient dans la première étape afin de limiter l'invasion des agents pathogènes dans le milieu interne (Paillard, 1992, 2004a). La présence de ce dépôt brun sur la face interne des valves est un phénomène de

Chapitre 1

reconnaissance du corps étranger *V. tapetis* par l'hôte. Cette première barrière à l'infection est une réponse immunitaire à part entière (Paillard, 2004a).

D'autres maladies affectant les bivalves ont pour conséquence des dépôts de conchioline sur la face interne des coquilles, par exemple après une infection de *Tapes aurea* par le trématode *Meiogymnophalus fossarum* (Bartoli, 1974) ou de *Crassostrea virginica* (Juvenile Oyster Disease) par la bactérie *Roseovarius crassostreae* (Bricelj *et al.*, 1992 ; Paillard *et al.*, 1996 ; Ford et Borrero, 2001 ; Paillard *et al.*, 2004b ; Maloy *et al.*, 2007).

3. 3. 3. 3. Les étapes de la transmission du *Vibrio tapetis* aux tissus mous

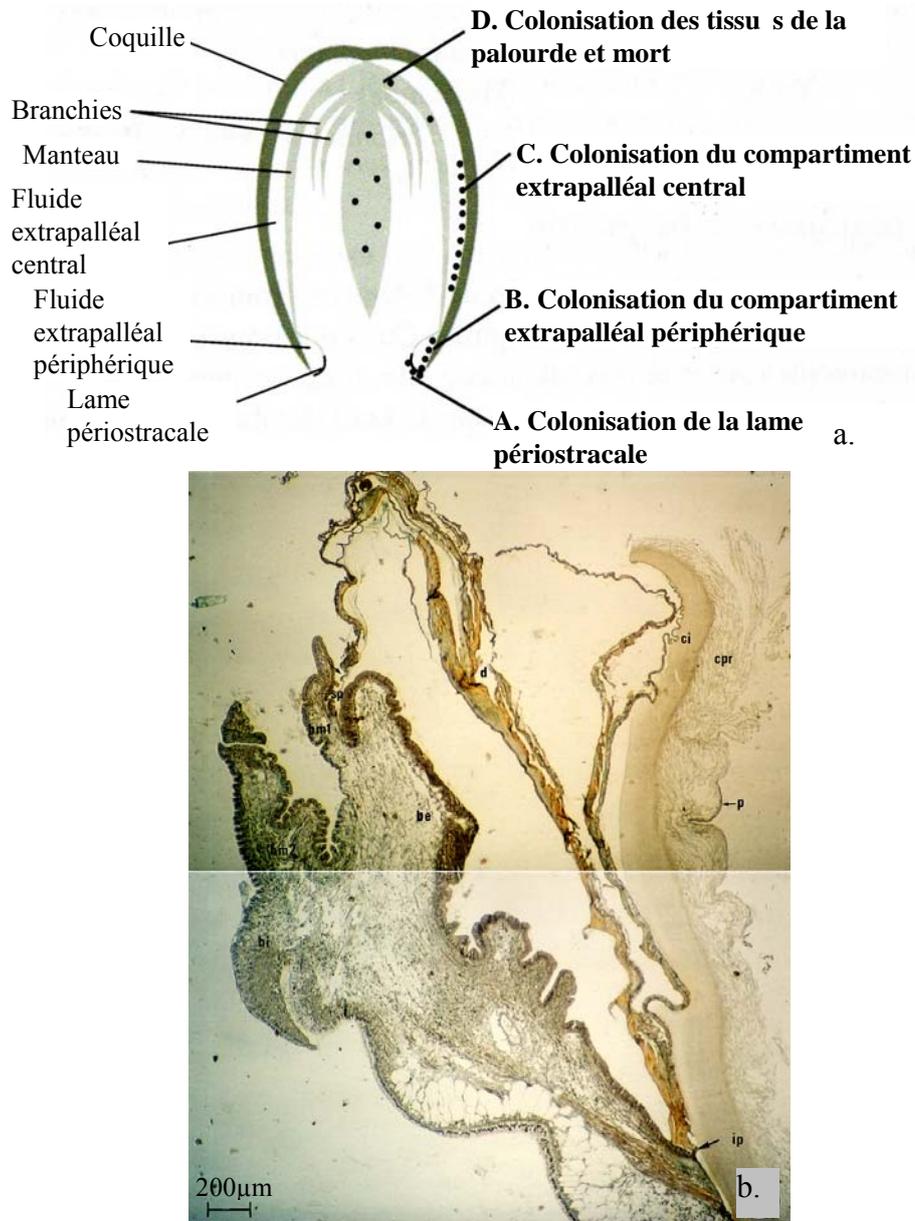


Figure 31 : a. Les stades de progression de la Maladie de l'Anneau Brun chez la palourde *Ruditapes philippinarum* ; A. colonisation de la lame périostracale, B. colonisation du compartiment extrapalléal périphérique, C. colonisation du compartiment extrapalléal central et D. colonisation des tissus de la palourde et mort (Paillard, 2004b ; Flye Sainte Marie, 2007). b. Coupe transversale du bord du manteau et de la coquille décalcifiée d'une palourde présentant un anneau brun, be : bourrelet externe, bi : bourrelet interne, bm1 : bourrelet médian primaire, bm2 : bourrelet médian secondaire, ci : couche interne coquillière, cpr : couche prismatique coquillière, d : dépôt brun, ip : impression palléale, lp : lame périostracale, p : périostracum, sp : sillon périostracal d'après (Paillard, 1992)

La progression de la maladie de l'anneau brun est illustrée par la figure 31 (Paillard, 2004b). Dans un premier temps, le pathogène *V. tapetis* adhère au périostracum (figures 30 b. et 31 a.A). Cependant, la maladie ne se développe qu'après pénétration du pathogène dans les fluides extrapalléaux. Les fluides extrapalléaux périphériques sont colonisés en premier (figure 31 a.B). C'est à ce stade que l'interaction entre les bactéries et le manteau et le périostracum induit la formation du dépôt brun (figure 30 c.). Les fluides extrapalléaux centraux peuvent également être colonisés si la progression de la maladie est importante. La formation du dépôt brun continue alors (figure 31 a.C). Si la progression en reste là, le *V. tapetis* se comporte comme un microparasite externe. Deux voies d'entrées parallèles dans le système hémolympatique existent pour le *V. tapetis*. Soit il entre par des lésions qui apparaissent au niveau du manteau qui est en contact avec l'anneau brun. Soit il entre directement dans un autre tissu à travers des lésions et à partir de la cavité palléale. Dans ces 2 cas, le *V. tapetis* pénètre dans le système hémolympatique, et colonise tous les tissus. La palourde meure alors rapidement par septicémie (figure 31 a.A) (Allam et al., 2002 ; Paillard, 2004b).

Des lésions branchiales et de la glande digestive sont parfois observées chez les palourdes malades, notamment quand la maladie est bien avancée (Plana et Le Pennec, 1991 ; Paillard, 1992 ; Plana, 1995 ; Allam *et al.*, 2002). Quand elle est bien développée (CDS supérieur ou égal à 4, cf. 3. 3. 4.), cette maladie affecte également le taux de filtration, la respiration et donc le métabolisme énergétique de la palourde (Flye Sainte Marie, 2007).

De plus, l'activité d'enfouissement des palourdes dans le sédiment est également affectée aux stades les plus élevés de la MAB. De ce fait, les palourdes les plus malades sont souvent retrouvées à la surface du sédiment (Gouletquer, 1989 ; Paillard, 1992). Ces palourdes qui ont une charge en *V. tapetis* importante (100 fois plus en moyenne qu'une palourde enfouie), sont plus accessibles aux prédateurs. Elles seraient donc une source de contamination et de dissémination du pathogène, notamment par l'intermédiaire des poissons mangeurs de palourdes comme les vieilles (Paillard, comm. pers.).

En milieu naturel, le développement de la MAB est associé à une baisse de la taille, du poids et des indices de condition (poids sec de chair/poids de la coquille), notamment pendant les périodes de mortalités hivernales ou estivales (Gouletquer, 1989 ; Paillard, 1992 ; Paillard et al., 1994). Une infection par *V. tapetis in vitro* induit un amaigrissement et une baisse de la teneur en glycogène de la chair (Plana, 1995 ; Plana et al., 1996). Ce polysaccharide est le

composé principal de réserve chez les mollusques (Gabbot, 1976, 1983 ; Lucas, 1993). Le développement de la MAB affecte donc de façon importante le bilan énergétique de l'hôte. Ceci est d'autant plus vrai que l'anneau brun est constitué de matrice organique coquillière très coûteuse énergétiquement (cf. 2. 4. 4. 5. ; 3. 3. 7.).

3. 3. 4. La classification de la MAB

3. 3. 4. 1. **Les stades de maladie ou Stades de Dépôt de Conchioline**

Les stades de développement et de réparation de la MAB peuvent être quantifiés en utilisant une typologie établie par Paillard et Maes (1994), et après des observations macroscopiques et microscopiques de la face interne des valves (figures 32 et 33). Les stades de la maladie ou de dépôt de conchioline (CDS Conchiolin Deposit Stage) prennent en compte l'extension et l'épaisseur du dépôt brun à l'aide d'une division des valves en zones (figure 32).

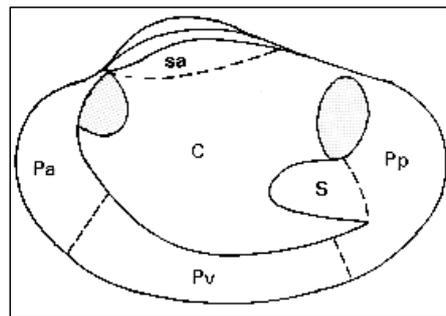


Figure 32 : Localisation des différentes zones sur la face interne des valves de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*. C : zone Centrale, Pa : zone Périphérique antérieure, Pv : zone Périphérique ventrale, Pp : zone Périphérique postérieure, S : zone Sinusale, sa : zone sub-articulaire (Paillard et Maes, 1994)

L'échelle de classification de la maladie comprend 7 CDS. Le stade *CDS 1* correspond à des palourdes ayant des points de dépôts bruns microscopiques. Ensuite, pour les stades suivants, les dépôts bruns sont visibles à l'œil nu. De plus, la valeur des CDS (*du CDS 2 au CDS 7*) croît avec l'extension et l'épaisseur du dépôt brun. Il commence à prendre une place significative dans la coquille à partir du stade *CDS 4*. Le stade *CDS 0* correspond à des palourdes sans dépôt brun visible à la loupe binoculaire.

Ces stades peuvent ensuite être regroupés en Groupes de Dépôts de Conchioline (CDG) : *CDG 0* = CDS 0, *CDG 1* = CDS 1 et 2, *CDG 2* = CDS 3, *CDG 3* = CDS 4 à 7.

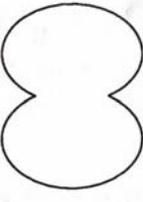
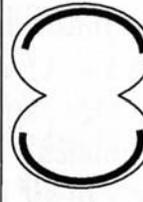
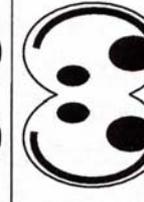
CDS	1	2	3	4	5	6	7
Symptômes							
	microscopique		visible à l'oeil nu				

Figure 33 : Echelle de classification des symptômes de la Maladie de l'Anneau Brun établie par Paillard et Maes (1994). Seuls les dépôts les plus fréquemment observés de chaque stade ont été représentés

3. 3. 4. 2. Les Stades de Réparation Coquillière

Cinq stades de réparation coquillière (Shell Repair Stage, SRS) ont également été décrits (Paillard et Maes, 1994). Le stade *SRS 0* correspond à des palourdes malades n'ayant pas commencé leur processus de réparation. Le stade *SRS 1* correspond à des palourdes malades qui commencent leur processus de réparation coquillière en déposant des petits amas calcifiés sur les dépôts bruns. Pendant le *SRS 2*, ces points s'étendent pour devenir des plaques calcifiées. Les palourdes sont en stade *SRS 2,5* quand les dépôts bruns sont presque entièrement recouverts de cristaux. Ce stade a été ajouté en 2004 (Paillard, 2004b). Le stade *SRS 3* correspond à la réparation complète de la coquille par des couches calcifiées. Les dépôts bruns ne sont visibles que par transparence.

3. 3. 4. 3. Les phases de la Maladie de l'Anneau Brun

Cinq phases de la MAB ont été définies en fonction du stade de maladie et du stade de réparation d'une palourde. Les individus sont en *phase 0* quand ils n'ont jamais été affectés par la maladie. Ils sont en *phase 1* quand ils sont malades mais n'ont pas débuté leur processus de réparation. Ils sont en *phase 2* quand ils sont malades et qu'ils ont commencé leur processus de réparation mais ne l'ont pas fini. Enfin, ils sont en *phase 3* quand ils ont totalement terminé leur processus de réparation (Paillard et Maes, 1994). La *phase 2,5* a été créée en 2004. Elle correspond aux palourdes ayant un SRS de 2,5 (Paillard, 2004b).

3. 3. 5. La réponse immunitaire face à la Maladie de l'Anneau Brun

La réponse immunitaire des palourdes japonaises affectées par la MAB a été très étudiée, notamment avec l'analyse des paramètres hémycytaires. Ceci est particulièrement dû au développement de l'outil cytomètre de flux depuis 1999. Les hémycytes sont particulièrement importants dans le mécanisme de résistance de la palourde japonaise face à la MAB.

3. 3. 5. 1. Les hémycytes de l'hémolymphe

Les premières études ont été faites en 1993, 1994 et 1996 par Oubella et ses collaborateurs, suite à des inoculations dans la cavité palléale de palourdes japonaises avec du *V. tapetis*. La Concentration Hémycytaire Totale (CHT) augmente rapidement dans l'hémolymphe puis reste assez stable (pendant 72 heures suivant l'injection d'après Oubella et al., 1993 et 1996 et pendant 2 semaines d'après Oubella et al., 1994) (Oubella *et al.*, 1993 ; Oubella *et al.*, 1994 ; Oubella *et al.*, 1996). C'est un phénomène d'hémocytose ou de mobilisation des hémycytes. En 1996, ces auteurs ont également montré que le nombre de hyalinocytes diminue et que le nombre de granulocytes augmente durant 3 jours. De plus, les bactéries pathogènes ne sont capables d'avoir des incidences sur les hémycytes que lorsqu'une dose supérieure ou égale à $5 \cdot 10^6$ bactéries/palourde est introduite dans la cavité palléale d'une palourde japonaise (Oubella et al., 1996).

Par ailleurs, en 1994, ces auteurs ont également montré un pic de l'activité leucine aminopeptidase (LAP) après l'inoculation, tant dans la fraction cellulaire que dans le sérum. De plus, la CHT et l'activité de la LAP dans le sérum sont inversement proportionnelles aux stades de la maladie (CDS) (Oubella et al., 1994).

Le *V. tapetis* a également la capacité d'inhiber l'adhésion et la mobilité des hémycytes *in vitro* (Choquet et al., 2003). En effet, l'activité cytotoxique de la bactérie induit la perte des filopodes des hémycytes et un changement dans leur morphologie. Ils deviennent ronds. Un test d'inhibition de l'adhésion sur le plastique a été mis au point par Choquet et al. Cette inhibition est détectable dès 5 bactéries par hémycyte et augmente en fonction du nombre de bactéries jusqu'à 50 bactéries par hémycyte. Elle est spécifique du *V. tapetis* et de *R. philippinarum* et est maximale à partir de 3 heures d'incubation (Choquet et al., 2003).

Par ailleurs, les réponses immunitaires sont très variables d'un individu à l'autre (Ford et Paillard, 2007). Les palourdes présentant des concentrations d'hémycytes élevées avant une

infestation avec du *V. tapetis*, développent faiblement la maladie et possèdent de meilleures capacités de survie (Paillard et Ford comm. pers.).

En 2007, Flye Sainte Marie et al. ont mesuré différents paramètres hématologiques hémolymphatiques que sont la CHT, les proportions en granulocytes et en hyalinocytes, l'activité de phagocytose, ainsi que la taille, le poids sec et l'indice de condition, de palourdes japonaises ramassées dans les sédiments du Golfe du Morbihan entre juillet 2004 et septembre 2005. La prévalence de la MAB n'a jamais excédée 10% et les stades de maladie (CDS) étaient inférieurs à 4. Aucun de ces paramètres mesurés ne varie avec la présence de la MAB excepté la taille des palourdes. Les hématocytes des palourdes japonaises ne seraient donc touchés par la MAB que quand les stades de maladie (CDS) sont supérieurs ou égaux à 4 (Flye Sainte Marie et al., 2009).

3. 3. 5. 2. Les hématocytes des fluides extrapalléaux

En plus d'avoir un rôle lors de la réparation coquillière des mollusques (cf. 2. 5. 2.), les hématocytes des fluides extrapalléaux sont impliqués dans le système immunitaire de la palourde. Les hématocytes des fluides extrapalléaux : Fluide Extrapalléal Central (FEC) et Extrapalléal Périphérique (FEP) présentent généralement les mêmes caractéristiques morphologiques : taille de la cellule, présence de filopodes et formation d'agrégats, et immunitaires : la CHT, les pourcentages de granulocytes et de cellules mortes, ainsi l'activité de phagocytose et l'activité du lysozyme dans la fraction cellulaire et dans le sérum, que les hématocytes de l'HEmolymph (HE). Cependant, la concentration en protéines dans le sérum est plus forte dans l'HE que dans le FEC, elle-même plus forte que dans le FEP. Par ailleurs, le compartiment central extrapalléal est stérile bactériologiquement. Ainsi, les fonctions de défense des bivalves s'organisent au sein de leur système circulatoire interne et semi-ouvert du système hémolymphatique, mais aussi dans les fluides extrapalléaux (Allam et Paillard, 1998).

En 2000, Allam et al. ont comparé les paramètres immunitaires de l'HE et du Fluide Extrapalléal (FE : FEC et FEP mélangés) de palourdes japonaises injectées avec du *V. tapetis* dans la cavité palléale. Comme lors des travaux de Oubella et al., 1993, 1994 et 1996, la CHT des HE et FE est plus forte chez les palourdes injectées que chez les palourdes témoins. Elle augmente particulièrement dans les premiers jours de l'expérimentation (jusqu'au 7^{ème} jour dans l'HE et jusqu'au 18^{ème} jour dans le FE). Chez les palourdes injectées, elle est plus élevée dans le FE que dans l'HE. Par ailleurs, le pourcentage de cellules mortes augmente également

dans l'HE et le FE, où les résultats sont assez similaires. Par ailleurs, contrairement à l'HE, la concentration en protéines diminue dans le FE suite à l'injection. Suite à l'injection, l'activité du lysozyme de la fraction cellulaire et du sérum est plus forte dans l'HE et le FE. Les valeurs de la fraction cellulaire sont assez similaires pour les 2 fluides, alors que pour le sérum elles sont plus hautes dans le FE que dans l'HE. Enfin, la réparation coquillière a été observée chez quelques palourdes injectées au bout des 7 semaines, suggérant ainsi que leur système de défense est assez efficace pour neutraliser le pathogène (Allam et al., 2000a).

En 2000, Allam et al. ont comparé les paramètres hématologiques et biochimiques de palourdes infectées ou non par la MAB dans les 3 fluides que sont : l'HE, le FEC et le FEP. Ces palourdes ont été ramassées dans le milieu naturel au sud de l'Angleterre. Les résultats sont généralement comparables avec ceux obtenus lors des injections expérimentales en termes de CHT, mortalité, activité du lysozyme dans le sérum, sauf le fait que l'activité du lysozyme du sérum est plus faible dans les FEC et FEP. Contrairement à l'expérimentation, la concentration en protéines du sérum des palourdes non symptomatiques est plus forte dans l'HE que dans le FEC. Il n'y a pas de différences significatives entre les différents fluides de palourdes malades. De plus, il n'y a aucune variation dans l'activité du lysozyme de la fraction cellulaire. Par ailleurs, il existe une relation positive entre l'avancée de la maladie et la CHT et la mortalité, et une relation négative avec la concentration en protéines du sérum et l'activité du lysozyme dans les 2 fractions et dans presque tous les cas. Enfin, chez certaines palourdes malades, le FEC n'est plus stérile (Allam et al., 2000b).

3. 3. 5. 3. La comparaisons avec les autres espèces

Le *V. tapetis* ainsi que ses produits extracellulaires provoquent des changements majeurs sur les hémocytes de l'hémolymphe de la palourde japonaise *in vitro* : une hausse de la CHT, du nombre d'hémocytes morts, une baisse de l'activité de phagocytose, et une altération de la taille et de la complexité des hémocytes. Ceci n'est pas observé chez les hémocytes d'autres espèces de bivalves comme *Mercenaria mercenaria* et *Crassostrea virginica*, ni avec d'autres espèces de bactérie. De plus, *V. tapetis* est capable d'induire des mortalités d'hémocytes à un taux plus élevé chez *R. philippinarum* que chez *M. mercenaria* ou *C. virginica*. La résistance des hémocytes face aux bactéries est donc à la fois spécifique de l'espèce pathogène et de l'espèce hôte (Allam et Ford, 2006).

En 2006, Allam et al. ont injecté la cavité palléale, les muscles adducteurs et l'espace extrapalléal de 4 bivalves présentant des susceptibilités différentes à la MAB : *R.*

philippinarum, *R. decussatus*, *M. mercenaria*, *C. virginica*. Les conséquences sont principalement une hausse de la CHT, du nombre de granulocytes, de la mortalité, de la concentration en protéines et l'activité du lysozyme, à la fois dans l'hémolymphe et dans les fluides extrapalléaux chez ces 4 espèces. Cependant, la plus grande influence a été relevée dans l'hémolymphe et dans les fluides extrapalléaux de la palourde japonaise injectée dans la cavité palléale et dans l'espace extrapalléal (Allam et al., 2006).

La proportion de granulocytes et la phagocytose ont également été étudiées. En effet, en 2001, Allam et al. ont comparé ces 2 paramètres dans les fluides : HE et FE, de palourdes japonaises venant des côtes françaises et des côtes américaines et des palourdes européennes venant des côtes françaises. Ces palourdes ont ensuite été injectées dans la cavité palléale avec du *V. tapetis*. Les palourdes européennes sont connues pour être plus résistantes que les palourdes japonaises. Après 4 semaines d'injection, la prévalence de la MAB est plus élevée chez les palourdes japonaises des côtes européennes que celles des côtes américaines, elle-même plus élevée que celles des palourdes européennes. Parallèlement, la CHT et la proportion en granulocytes sont plus fortes chez les palourdes malades que les palourdes non injectées. L'activité de la phagocytose est plus élevée chez les palourdes non injectées que chez les palourdes injectées chez les palourdes japonaises françaises, alors que c'est le contraire chez les palourdes européennes. Il n'y a pas de différence pour les palourdes japonaises américaines. Chez les palourdes japonaises des côtes françaises affectées, la CHT, la proportion de granulocytes et la phagocytose sont plus élevées dans le FE que dans l'HE. **La résistance des palourdes face à la MAB seraient donc fortement liée à la phagocytose et aux principaux hémocytes qui phagocytent : les granulocytes (Allam et al., 2001). La résistance de la palourde face à la MAB sera particulièrement étudiée dans cette thèse.**

3. 3. 5. 4. Conclusion

Toutes ces études ont permis de montrer certains changements dans le système immunitaire de la palourde (hémocytes et sérum) suite à une infection du *V. tapetis* qui sont : une hausse de la CHT dans l'hémolymphe suivie d'une baisse au bout de quelques jours, une hausse de la CHT dans les fluides extrapalléaux, une augmentation du pourcentage de cellules mortes à la fois dans l'hémolymphe et dans les fluides extrapalléaux, une hausse de la concentration en granulocytes, ainsi qu'une baisse de l'activité de phagocytose, une hausse de l'activité du lysozyme des fractions cellulaires et du sérum et une hausse de l'activité LAP des fractions cellulaires et du sérum (Oubella *et al.*, 1993 ; Oubella *et al.*, 1994 ; Oubella *et al.*,

Chapitre 1

1996 ; Allam *et al.*, 2000a ; Allam *et al.*, 2000b ; Allam *et al.*, 2001 ; Allam et Ford, 2006 ; Allam *et al.*, 2006) (figure 34).

Toutes ces études suggèrent une mobilisation de cellules immunocompétentes vers les fluides extrapalléaux proches du site infecté, suggérant un rôle de ces fluides dans la préservation de la santé des palourdes (Allam *et al.*, 2000a ; Allam *et al.*, 2000b ; Allam *et al.*, 2001). L'infiltration d'hémocytes au niveau du tissu conjonctif du manteau avait déjà été observée chez des palourdes françaises et espagnoles infectées par le *V. tapetis* (Santamaria *et al.*, 1995 ; Allam, 1998). Ces cellules auraient donc un rôle actif dans la lutte contre la maladie.

Les bivalves ont généralement une forte capacité à éliminer les bactéries car leur survie en dépend (Greenberg *et al.*, 1982 ; Bayne, 1983 ; Kumazawa *et al.*, 1985 ; Renwranz, 1986 ; Martinez-Manzanares *et al.*, 1991). Cependant la palourde japonaise ne réussit pas à éliminer le *V. tapetis*. Elle a de moins bonnes capacités immunitaires que d'autres bivalves face à cette bactérie (Allam *et al.*, 2001 ; Allam et Ford, 2006 ; Allam *et al.*, 2006). De plus, cette bactérie reste à une forte concentration dans la circulation hémolympatique et colonise les organes de l'hôte, ce qui le tue (cf. 3. 3. 3.) (Allam *et al.*, 2002).

La figure 34 montre toutes les réponses de la palourde japonaise face à la MAB à plusieurs échelles.

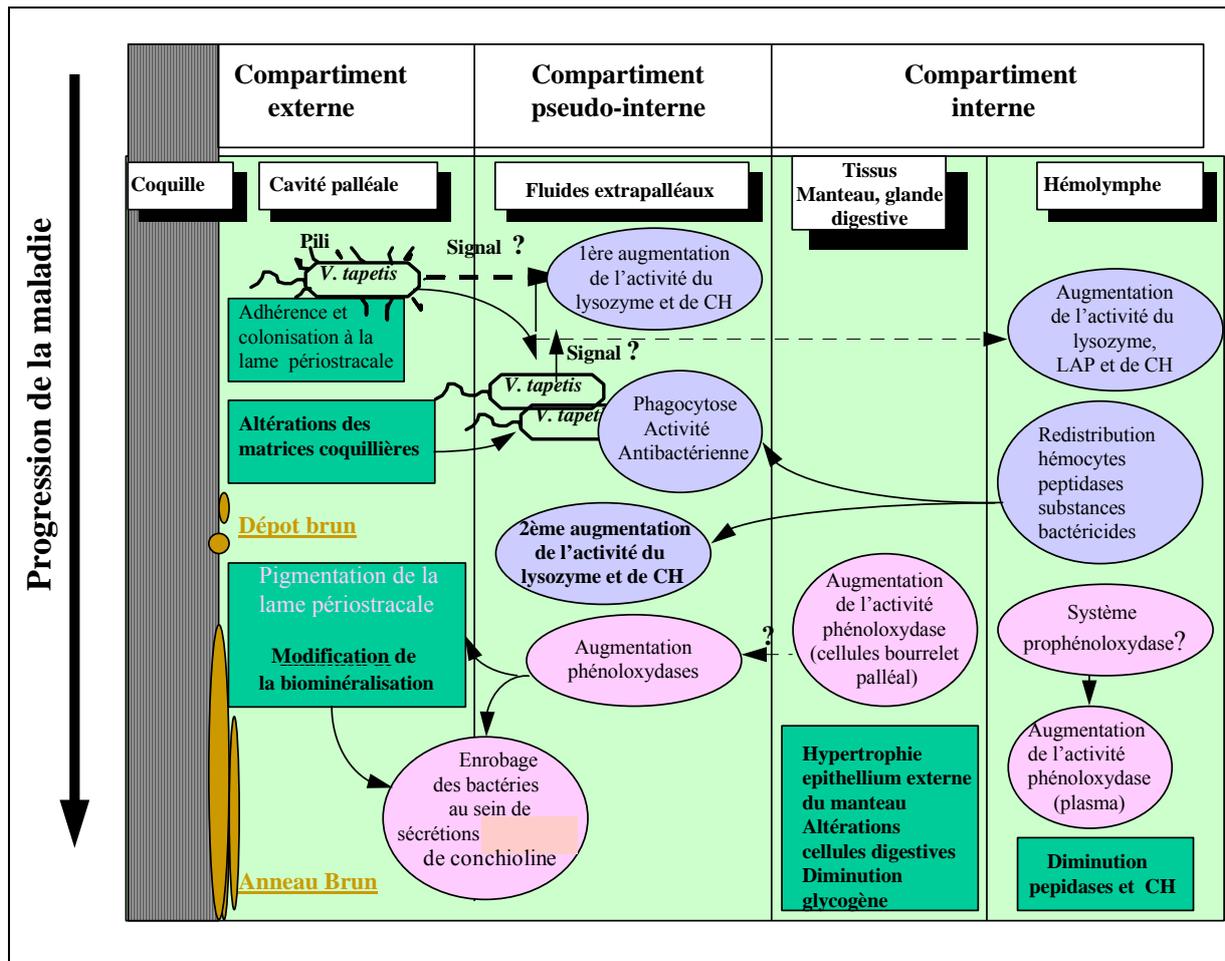


Figure 34. Schéma synthétique représentant les variations des paramètres immunitaires et les modifications des processus physiologiques dans les différents compartiments de la palourde *Ruditapes philippinarum* lors de la progression de la Maladie de l'Anneau Brun ; modifications des paramètres immunitaires dans les fluides corporels, voies possibles d'intervention du système phénoloxydase, perturbations physiologiques et lésions associées à la maladie, d'après (Paillard, comm. pers.)

3. 3. 6. Les influences de l'environnement sur la Maladie de l'Anneau Brun

3. 3. 6. 1. La température

La température est un des facteurs environnementaux majeurs contrôlant le développement de cette maladie. Elle influence à la fois le pathogène et l'hôte.

En effet, la croissance de l'agent pathogène *V. tapetis* est étroitement contrôlée par la température (Maes, 1992 ; Paillard et al., 1997). Sa température optimale de croissance est

relativement faible et se situe aux alentours de 20°C (Maes, 1992 ; Haberkorn, 2005). De plus, des températures supérieures à 27-30°C sont létales pour cette bactérie (Maes, 1992 ; Haberkorn, 2005).

Entre 15 et 21°C, l'intensité du développement des symptômes est inversement corrélée à la température (Maes, 1992). La température optimale pour le développement de cette maladie est proche de 14°C. Cependant les températures inférieures à 3°C inhibent la croissance et la pathogénicité de *V. tapetis* (Paillard et al., 1997). Ceci explique pourquoi la répartition de la MAB reste limitée à des latitudes moyennes, notamment en Europe (figure 29).

Dans le milieu naturel, l'évolution de la MAB suit souvent un cycle annuel (Paillard *et al.*, 1997 ; Paillard, 2004a ; Soudant *et al.*, 2004). Le nombre d'individus malades augmente en fin de période hivernale (février – mars), reste relativement élevé pendant le printemps puis décroît à partir du mois de mai. Ce cycle est principalement expliqué par les variations de la température (Paillard *et al.*, 1994 ; Paillard *et al.*, 1997 ; Paillard, 2004b ; Paillard, 2004a ; Paillard *et al.*, 2004a). Par exemple, en 1987 sur le site de Brouéno (Finistère), la prévalence de la MAB avait augmenté pendant les derniers mois de l'année jusqu'à atteindre 60 à 70 % en janvier 1988. Ensuite, cette prévalence avait montré une décroissance jusqu'à l'été 1988 (Paillard et al., 1994). De plus, Soudant et al. en 2004 avaient observé une très forte mortalité au mois de février 2001 en rade de Brest (proche de 100%, T° 8 °C).

La température influence également les paramètres immunitaires de l'hôte (Paillard et al., 2004a). Ces résultats seront décrits dans le paragraphe 3. 4.

3. 3. 6. 2. La salinité

L'influence de la salinité a également été observée sur des palourdes injectées avec du *V. tapetis* dans la cavité palléale. La prévalence de la MAB était plus élevée et le nombre total d'hémocytes plus réduit à 20‰, qu'à 40‰ où les paramètres immunitaires étaient meilleurs : augmentation du nombre d'hémocytes, de hyalinocytes, de l'activité de la phénoloxydase et de la phagocytose (Reid et al., 2003b).

3. 3. 6. 3. La granulométrie et la manipulation

La granulométrie du sédiment affecte aussi significativement le développement de la MAB (Paillard, 2004b). Dans des populations naturelles, il existe une relation positive entre la

prévalence et l'abondance en particules de grande taille dans le sédiment (Flye-Sainte-Marie et al., 2008).

La prévalence de la MAB dépendrait également de la manipulation des individus lors des élevages de palourdes (Flye Sainte Marie, 2007), où suite à des prélèvements successifs pour un même individu de fluides hémolympatiques ou extrapalléaux (Paillard et Ford, comm. pers).

3. 3. 7. Modélisation de la Maladie de l'Anneau Brun

Une modélisation des interactions entre l'hôte palourde japonaise, le pathogène *Vibrio tapetis* et l'environnement a été créée afin de mieux connaître l'importance de la MAB sur les allocations énergétiques de la palourde (Flye Sainte Marie, 2007).

Le développement des maladies résulte souvent d'interactions entre l'environnement, l'hôte et le pathogène. Par exemple, l'environnement peut influencer la transmission du pathogène à l'hôte, ainsi que la physiologie du pathogène et de l'hôte. Le développement du pathogène au sein de l'hôte dépend directement des facteurs environnementaux, mais aussi de la capacité de l'hôte à lutter contre le pathogène. Cette capacité est influencée par l'environnement au travers de la physiologie de l'hôte (Flye Sainte Marie, 2007).

Un premier modèle basé sur le concept du « Scope For Growth » a été créé. C'était un modèle individuel de croissance et de reproduction de la palourde japonaise qui a été construit et calibré, puis qui a servi comme base au développement d'un modèle décrivant les interactions entre l'environnement, l'hôte et le pathogène dans le cas de MAB (Flye Sainte Marie, 2007).

Le modèle de base a permis de simuler la croissance, la reproduction et l'indice de condition de la palourde sous le forçage de la disponibilité trophique et de la température. Il a également montré que l'estimation de la disponibilité trophique pour une espèce endogée telle que la palourde est difficile car le microphytobenthos et la matière détritique représentent également une part non négligeable du régime alimentaire. La chlorophylle *a* dans la colonne d'eau n'est ainsi pas un bon estimateur de la ressource trophique de la palourde japonaise. Par ailleurs, ce modèle a mis en évidence la difficulté de validation d'un modèle individuel lorsque des phénomènes asynchrones tels que les pontes ont lieu au sein d'une population (Flye Sainte Marie, 2007).

Chapitre 1

Cette base a ensuite été complexifiée pour créer un modèle d'interactions entre l'environnement, l'hôte et le pathogène, dans le but de lier le développement de la maladie au bilan énergétique de la palourde. Le système de défense de l'hôte est sous la dépendance de l'indice de condition et de la température. Des individus avec différents phénotypes ont été simulés en faisant varier les valeurs des paramètres du modèle impliqués lors du développement de la maladie. Cette variabilité phénotypique a permis de fournir une explication potentielle à la variabilité inter-individuelle observée lors du développement de la maladie (Flye Sainte Marie, 2007). Dans ce modèle, le système immunitaire de l'hôte était représenté par la concentration et l'activité hémocytaires (taux de phagocytose), et la production du carbonate de calcium était liée au processus de réparation. Les individus qui guérissaient le mieux et le plus vite sont ceux qui présentaient conjointement de forts taux d'assimilation de nourriture, de phagocytose et de calcification. D'autant plus que le *V. tapetis* inhibe la capacité de phagocytose du bivalve. Les simulations de ce modèle ont permis par exemple, de représenter la survie du *V. tapetis* en fonction de la variabilité du taux de phagocytose et de l'indice de condition de l'hôte. Ceci est impossible directement par l'expérimentation (Paillard, comm. pers.).

Dans un deuxième temps, un modèle basé sur la théorie du "Dynamic Energy Budget" (DEB) a été construit afin de mieux comprendre l'impact de la MAB sur le bilan énergétique de la palourde japonaise et en particulier sur ses coûts de maintenance (Flye Sainte Marie, 2007). La théorie DEB permet la modélisation des bilans de masse et d'énergie dans les organismes vivants. En effet, elle décrit les flux d'énergie au travers des organismes : de l'assimilation de la nourriture à l'allocation pour la croissance, le développement, la reproduction et la maintenance. Les palourdes très touchées par la MAB étaient particulièrement touchées par une perte de poids, suggérant que la MAB affectait le bilan énergétique. Cette perte provient (1) de la diminution de la capacité de filtration et du temps passé en activité de filtration, donc d'une diminution des acquisitions d'énergie (2) d'une augmentation des coûts de maintenance due à la réponse immunitaire et à la réparation des lésions induites par la maladie, indépendamment de la filtration. Le couplage entre des mesures expérimentales et le modèle a permis d'évaluer de façon quantitative et dynamique cette augmentation des coûts de maintenance (Flye Sainte Marie, 2007). Le lien entre ce travail et la réparation coquillière sera décrite dans le paragraphe suivant.

3. 4. *La guérison de la palourde par la réparation coquillière*



© Levasseur

Figure 35 : La réparation coquillière totale d'une palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*, après une attaque par le *Vibrio tapetis* et le développement d'un anneau brun ; vue d'un animal vide

3. 4. 1. Introduction

Comme le montre ce travail bibliographique, le développement du dépôt brun a déjà été très bien étudié lors de précédents travaux, contrairement à la guérison de la maladie de l'anneau brun associée au mécanisme de réparation coquillière (Paillard, 1992).

Certaines palourdes japonaises affectées par la MAB sont capables de recouvrir le dépôt brun par des sécrétions coquillières dispersées puis par une couche de coquille continue, et ce quelle que soit l'épaisseur du dépôt brun (Paillard et Maes, 1995a, b). La palourde est considérée comme guérie quand la couche cristalline recouvre entièrement le dépôt brun (SRS 3) (Paillard et Maes, 1994 ; Paillard, 2004b). Ce processus a été divisé en différents stades de réparation coquillière (SRS) présentés précédemment (cf. 3. 3. 4. 2.).

Dans leurs réponses face au *V. tapetis*, les palourdes japonaises présentent successivement 2 étapes dans le système de défense externe (cf. 3. 3. 3. 3.). Le mécanisme de réparation est la deuxième étape, durant laquelle les bactéries et la conchioline sont recouvertes par une couche coquillière de réparation, afin d'isoler les bactéries du manteau, des fluides extrapalléaux et des autres organes (Paillard et al., 1994).

Le processus de réparation coquillière est un mécanisme de défense très courant chez les mollusques (cf. 2. 5. 1.), même si il a peu été étudié dans le cas de la palourde japonaise

face à la MAB. **De plus, c'est un des premiers modèles de réparation coquillière induite après une infestation parasitaire bactérienne. Les seules études qui ont été effectuées sur cette réparation concernent la composition biochimique de la couche de réparation, l'influence des facteurs environnementaux, la modélisation et une expérience de réparation artificielle.**

3. 4. 2. Une étude biochimique

En 1989, Gouilletquer a montré que la matrice organique de la coquille réparée n'avait pas la même composition en acides aminés que celle de la coquille saine. Ces travaux montraient une augmentation très forte des teneurs en cystéine, en glycine, en acides aminés acides : acide aspartique et acide glutamique, et en acides aminés divers : la proline, la lysine, l'histidine et l'arginine, dans la matrice soluble, et de tous les acides aminés dans la matrice insoluble (en nmol.mg⁻¹) (Gouilletquer, 1989).

3. 4. 3. L'influence de l'environnement

Le mécanisme de réparation coquillière est fortement influencé par les paramètres de l'environnement, notamment par la température (Paillard et al., 2004a), la salinité (Reid et al., 2003b), et la teneur en aliments dans le milieu (Flye Sainte Marie, 2007). Par exemple, en 1988 dans le milieu naturel, sur le site de Landéda, la réparation était plus faible en janvier et février avec juste des SRS 1, qu'au printemps et en été 1988 avec l'apparition des SRS 2, 2,5 et 3 (Paillard et Maes, 1994).

En 2004, Paillard et al. ont injecté la cavité palléale de palourdes japonaises avec du *V. tapetis* et les ont maintenues en bacs à différentes températures : 8, 14 et 21°C. Une palourde maintenue 30 jours à 21°C montre des capacités immunitaires supérieures à celle maintenue à 14°C. En effet, le pourcentage de mortalité hémocytaire est plus faible et les activités de la LAP et des lysozymes sont plus élevées. De plus chez ces palourdes, le taux de réparation coquillière est plus fort à 21°C, qu'à 18°C et qu'à 14°C. La température a donc une influence positive sur la défense immunitaire de la palourde et sur la réparation coquillière. Il serait même possible que cette hausse de la réparation coquillière soit liée à l'amélioration des paramètres immunitaires, mais aucune corrélation n'avait alors été recherchée (Paillard et al., 2004a).

3. 4. 4. La modélisation

Le coût énergétique de la réparation coquillière a été estimé dans le but d'être pris en compte dans le modèle « Scope For Growth » sur les interactions entre l'environnement, l'hôte et le pathogène (Flye-Sainte-Marie et al., 2007). En effet, Flye Sainte Marie et al., ont écrit d'une part que selon Palmer (1992), le coût énergétique principal de la production de coquille chez les mollusques marins était principalement attribué la matrice organique coquillière et d'autre part que Gouletquer et Wolowicz (1989) avaient montré que le pourcentage de matrice organique dans la coquille de palourde japonaise était compris entre 2 et 3% du poids total de la coquille (Gouletquer et Wolowicz, 1989 ; Palmer, 1992). Ils ont donc posé l'hypothèse que le cout énergétique de la réparation coquillière ne devait pas être très élevé. Cependant aucune mesure de matrice organique dans la couche de réparation n'avait alors été faite (Flye-Sainte-Marie et al., 2007). C'est pourquoi il semblait très important de quantifier cette matrice organique durant ce travail de thèse.

3. 4. 5. La réparation artificielle

Dans le but d'étudier la réponse de la palourde japonaise aux altérations coquillières, des trous ont été fait dans plusieurs coquilles. Ces trous ont ensuite été bouchés avec de fines lamelles de verre stériles de recouvrement. Quelques jours après une inoculation avec le *V. tapetis*, des hémocytes apparaissaient sur la lamelle (Allam, 1998). La nature du polymorphe de carbonate de calcium de ces cristaux n'avait pas été identifiée.

En conclusion, le phénomène de réparation coquillière n'a été que peu décrit dans la littérature. De plus, les seules études qui ont été faites étaient assez succinctes. Comme ce processus semble jouer un grand rôle dans la résistance de la palourde face à la MAB, il sera étudié en détails durant cette thèse.

Chapitre 2. Résistance de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* face à la Maladie de l'Anneau Brun : une étude de stocks sélectionnés montrant un processus de guérison par la réparation coquillière

Article 1: Resistance to Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: a study of selected stocks showing a recovery process by shell repair

Les populations européennes de palourdes japonaises *Ruditapes philippinarum* sont affectées par la Maladie de l'Anneau Brun (MAB). La MAB est causée par la bactérie *Vibrio tapetis*. Elle est caractérisée par l'accumulation d'une matrice organique brune sur la surface interne des coquilles. Les palourdes qui guérissent de cette maladie, développent une couche coquillière blanche recouvrant la matrice brune.

Le but de ce deuxième chapitre est de comprendre si différents stocks de palourdes japonaises peuvent présenter des différences de susceptibilité à la MAB.

Pour ce faire, des stocks de palourdes japonaises montrant des capacités de résistance à la MAB différentes ont été suivis et étudiés depuis 2000. Lors de ce travail, deux stocks ont été examinés à travers trois générations : un stock peu sensible et un stock hautement sensible à la MAB. Ces stocks ont été sélectionnés par le LEMAR et une ferme aquacole : la SATMAR. Ils ont été suivis à la fois dans le milieu naturel et lors d'infections expérimentales en laboratoire. Dans tous les cas, le stock le moins sensible était constitué de palourdes présentant des symptômes de MAB moins importants voire inexistantes, par rapport au stock hautement sensible. De plus, la réparation coquillière chez les palourdes du stock le moins sensible était plus avancée, voire totale chez les palourdes guéries. Les palourdes utilisant ce mode de résistance étaient plus nombreuses que celles ne présentant aucun symptôme de MAB. Ces résultats indiquent que certaines palourdes sont moins vulnérables que d'autres face à une attaque de *V. tapetis*. Cependant, la proportion de ces palourdes résistantes n'augmentait pas avec les générations. Ceci pouvait être dû au fait que les géniteurs étaient maintenus sur l'île de Chausey, où la MAB est assez rare et donc où la pression de sélection est faible.

Chapitre 2

Dans un deuxième temps, afin de mieux comprendre le phénomène de résistance des palourdes face à la MAB, le mécanisme de réparation coquillière a été étudié. Pour ce faire, la face interne des valves de palourdes appartenant aux 2 stocks (peu sensible et hautement sensible à la MAB) a été analysée à l'aide d'un microscope électronique à balayage. Les observations des coquilles affectées par la MAB montrent que durant le processus de réparation, des cristaux de calcium sont progressivement déposés sans organisation particulière jusqu'à que la zone affectée soit totalement recouverte. **A la fin du processus de réparation coquillière, une couche organique finale recouvre entièrement les amas de cristaux de calcium. Cette couche semble essentielle dans le processus de guérison.** En comparaison avec des coquilles saines, cette microstructure de la couche de réparation coquillière semble différente tant au niveau de l'organisation des cristaux, qu'au niveau de la matrice organique.

En conclusion, les résultats présentés dans ce chapitre 2 indiquent que la capacité de réparation coquillière des palourdes joue un grand rôle dans le développement d'une résistance face à la MAB. C'est pourquoi, l'étude de ce mécanisme va être poursuivie à différentes échelles dans la suite de la thèse.

Un article présentant cette étude est publié dans le journal *Journal of Invertebrate Pathology*. Sa référence est *Journal of Invertebrate Pathology* 104 (2010) 8-16.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

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

Resistance to Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: A study of selected stocks showing a recovery process by shell repair

Nolwenn Trinkler^a, Gérard Sinquin^b, Jérémy Querne^a, Christine Paillard^{a,*}

^a IUEM, UMR CNRS 6539, Technopole Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

^b GME – UFR des Sciences & Techniques, 6 av. Victor Le Gorgeu, CS 93837, 29238 Brest Cedex 3, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 July 2009
Accepted 15 December 2009
Available online xxx

Keywords:
Vibrio tapetis
Bacterial infection
BRD
Disease resistance
Shell repair
SEM
Scanning electron microscopy
Calcium crystals
Organic layer

ABSTRACT

European stocks of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* are affected by the Brown Ring Disease (BRD), which is caused by *Vibrio tapetis*. BRD is characterized by an accumulation of a brown organic matrix on the inner face of the shell. Clams that recover from BRD develop a white mineralized layer covering the brown matrix. Stocks of clams that showed resistance to BRD development, as enhanced recovery, have been monitored since 2000. We have examined two selected stocks: a Low Susceptibility (LS) stock and a High Susceptibility stock (HS), over three generations. The LS stock showed less evidence of the BRD symptoms, and more evidence of total shell repair, both in the field and following experimental challenge with *V. tapetis*, indicating that some clams may be less vulnerable to a *V. tapetis* attack than others. The inner face of the valves of the LS and HS clams of the two last generations were analysed with scanning electron microscopy. Examination of shells from BRD-affected clams showed that during the repair process, calcium crystals were progressively laid down until the affected zone was entirely covered. By the end of the shell repair process, a final organic layer covered the calcium crystal mounds. This layer seemed essential in the recovery process. The results indicate that the shell repair capability of the clams is the principal mechanism implicated in the development of BRD resistance in the Manila clam stocks. However, this resistance did not increase with generation because the broodstock was maintained at a site where selection pressure was low, due to a low prevalence of *V. tapetis*.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, originates from the Indo-Pacific. It is one of the world's main aquaculture species. In 2007, more than 3 million tons of clams were produced in 15 countries. The price per unit weight was 4–5 times higher than the price of oysters or mussels (Goulletquer, 2006).

The Manila clam was introduced into France for aquaculture purposes between 1972 and 1975, to England in 1980, and to Spain and Italy in 1985 (Breber, 1985; Flassch and Leborgne, 1992). The main reason for its importation was a faster growth rate than the related, indigenous clam, *Ruditapes decussatus*. Until 1986, the production of the Manila clam increased in France. Then, in 1987, mass mortalities of cultured Manila clams occurred in Landeda (North Finistere, Brittany), which was the first production site in France (Flassch et al., 1992; Paillard and Maes, 1990). In Paillard et al. (1989), showed that mortalities were associated with the presence of a brown deposit on the inner surface of the valves

(Paillard and Maes, 1990). This disease was named Brown Ring Disease (BRD) and is caused by a bacterium named *Vibrio tapetis* (Borrego et al., 1996; Paillard and Maes, 1990). BRD has decimated the culture of clams in Brittany. BRD prevalence has remained high and clam culture has not recovered at the Landeda site (Paillard, 2004). The disease has also spread along the French Atlantic coast and into other countries including England, Ireland, Spain, and Italy associated with transfer of clams (Paillard, 2004).

The BRD process has been extensively studied (Allam et al., 2001, 2000; Flye-Sainte-Marie, 2007; Paillard, 2004; Paillard et al., 2004; Soudant et al., 2004). *V. tapetis* colonizes the periostracum and inhibits the normal process of shell biomineralization. The presence of the bacterium provokes an accumulation of a brown organic matrix on the inner face of the shell (Paillard and Maes, 1995a,b). Subsequently, clams may die due to a systemic infection as the bacteria invade the circulatory system. Some clams recover from the infections. These clams exhibit a white layer covering the brown matrix (Paillard and Maes, 1995a,b). This phenomenon of repair is not fully understood. Other shell repair processes of bivalves have been described after parasite infestations, such as after a bacterial attack in *Crassostrea virginica* (Cheng, 1967; Lewis et al., 1996).

* Corresponding author. Fax: +33 2 98 49 87 45.
E-mail address: christine.paillard@univ-brest.fr (C. Paillard).

Since 2000, we have followed a French population of Manila clams that showed resistance capacity. In April 2000, a single stock originating from a hatchery located at Marennes in southwestern France was sowed in four locations on the French Atlantic coast: Chausey Islands, Bay of Brest, Gulf of Morbihan and Marennes. BRD symptoms were monitored every 3 months. In April 2001, after 12 months in the Gulf of Morbihan, this hatchery stock had a BRD prevalence of 1.6% while the natural population from the Gulf of Morbihan had a prevalence of 30%. Although, these results suggested that the hatchery-produced clams might be more resistant to BRD, a direct comparison is not reliable because the wild clams were older and had been exposed longer in the field. In the present study, the hatchery stock deployed by Soudant et al. (2004) was considered the first generation of a Low Susceptibility stock. Then the selection was pursued by a definite programme in a hatchery.

In the present study, stocks with clams of Low and High Susceptibility (Table 1) were followed for the development of BRD symptoms over three generations including the 2000 group. They were followed in the field and some were experimentally challenged in the laboratory to assess their resistance capacity. In order to understand the recovery process, we also undertook scanning electron microscopy observations of the inner face of the valves of the last two generations of both groups of clams.

2. Materials and methods

2.1. History of the three generations of clam stocks

Since 2000, three generations of Manila clams with a defined origin have been produced by SATMAR, a French hatchery that produces oysters, clams, mussels and scallops. The stocks were produced by mass spawning and their lineage was documented by SATMAR (Table 1). The early life stages were identical for High Susceptibility (HS) and Low Susceptibility (LS) stocks. Spawning was made at the SATMAR hatchery at Leucate (France). Larvae remained 12 days (~140 µm) in this hatchery and were then transferred to the SATMAR Bouin (France) facility for a month until metamorphosis. Juvenile clams were then transferred to the SATMAR Marennes (France) nursery where they remained for 4–10 months until they reached a length of 6–10 mm, at which time they were deployed to field sites or used in laboratory challenges. Juveniles of LS stocks were planted at a site in the Chausey Islands and juveniles of HS stocks in Marennes. Parental stocks were thus maintained in separate locations and experimented adults (25–35 mm) came from these same locations (LS stocks from Chausey Islands and HS stocks from Marennes) (Table 1). Both groups of experimented juveniles of the third generation came from the SATMAR Marennes nursery. Over three generations, BRD susceptibility was compared between a LS stock and a HS stock. The HS was the standard stock of the SATMAR hatchery (Table 1).

2.1.1. First generation study

The field results of the first generation, obtained in 2000 and 2001, were published by Soudant et al. (2004). The hatchery stock then was named Low Susceptibility 1 (LS1). In 2002, adults of this generation were studied again. Their response to BRD was compared with the response of High Susceptibility 1 (HS1) clams. Clams sowed at Chausey Islands (LS1) and Marennes (HS1) were collected and challenged by *V. tapetis* in the laboratory. On June 8, 2002, 50 clams of HS1 stock and 50 of LS1 were injected with *V. tapetis* CECT 4600 and 50 of each with sterile seawater (SSW) (controls, cf 2.3.). After a month, the BRD syndrome was characterized (BRD prevalence, CDG: Conchiolin Deposit Group and SRS: Shell Repair Stage, cf 2.4.). Each day dead clams were collected.

Table 1 Experimental details and history of the stocks across generations. LS: Low Susceptibility stocks; HS: High Susceptibility stocks; LS1 and HS1: first generation stocks; LS2a, LS2b and HS2: second generation stocks; LS3 and HS3: third generation stocks. The left of table presents history of stocks before experimentations, and the right section presents experimental parameters.

	Broodstock (site, stock)	Spawning date	Deployed (place, date)	Adults/ juveniles	Origin	Experiment	Dates of experiments
LS	Marennes	1999	April 2000, Chausey Islands, Bay of Brest, Morbihan Gulf, Marennes	Juveniles	SATMAR Marennes	Soudant et al. (2004)	2000–2001
LS2a	Chausey, LS1	2002	Chausey, 2003	Adults	Chausey, field	Injection of <i>V. tapetis</i> Deployed at the Landeda site	8 June 2002 January and February 2005
LS2b	Chausey, LS1	2002	Chausey, 2003	Adults	Chausey, field	Deployed at the Landeda site	January and February 2005
LS3	Chausey, LS2a	2006		Juveniles	SATMAR Marennes	Injection of <i>V. tapetis</i>	March 2006
HS	Marennes			Adults	SATMAR Marennes	Injection of <i>V. tapetis</i>	May 2006
HS1	Marennes	1999	April 2000, Marennes	Adults	Natural population from the Morbihan Gulf	(Soudant et al., 2004)	2000–2001
HS2	Marennes, HS1	2002	April 2000, Marennes	Adults	Marennes, field	Injection of <i>V. tapetis</i> Deployed at the Landeda site	8 June 2002 January and February 2005
HS3	Marennes, HS2	2006	Marennes and Chausey, 2003	Juveniles	SATMAR Marennes	Injection of <i>V. tapetis</i>	March 2006
				Juveniles	SATMAR Marennes	Injection of <i>V. tapetis</i>	May 2006

Please cite this article in press as: Trinkler, N., et al. Resistance to Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: A study of selected stocks showing a recovery process by shell repair. J. Invertebr. Pathol. (2010), doi:10.1016/j.jip.2009.12.007

Both disease and survival traits of HS1 and LS1 results were compared.

2.1.2. Second generation study

In October 2005, resistance of the second generation adults was studied. In this generation, three strains were made (LS2a, LS2b and HS2) (Table 1) and planted on the Broënnou site (Landeda, France): 2000 adult clams per strain on 14 m² (143 clams m⁻²). The two different LS stocks, LS2a and LS2b, were produced from different parents. The Landeda site was selected for the test because clams deployed there typically develop much higher BRD prevalence (close to 100%; Paillard and Maes, 1994) than other sites. At a period of high BRD prevalence, three samplings were made: January 5 and 16 and February 1, 2006. Collections were made in winter because BRD is a cold-water disease and prevalences are typically highest at this season (Paillard et al., 1997). One hundred clams were harvested at each sampling for assessment of the BRD syndrome (cf 2.4.). At each sampling, gaping clams and boxes (articulated valves not containing meat) were collected on the surface of the sediment to estimate mortality.

2.1.3. Third generation study

In 2006 and 2007, LS3 juveniles were compared with HS3 juveniles. Two laboratory experiments were performed: from November 3, 2006 to December 4, 2006 and from May 3, 2007 to June 6, 2007. During the first experiment, clams from two replicate batches of 150 clams each from each of the two stocks were each injected with SSW (controls) and another two replicates of 150 clams from each, with *V. tapetis* CECT 4600 (cf 2.3.). Fifteen clams in each group were sampled each week over 3 weeks. At the fourth week, all remaining clams were sampled.

In the second experiment, two replicates, each of 200 clams from each stock were injected with SSW and two other replicates of 200, with *V. tapetis* CECT 4600 (cf 2.3.). After 4 weeks and 6 weeks, 100 clams of each group were sampled. The BRD syndrome was characterized (cf 2.4.). The sampling regime was chosen because in 1990, Paillard and Maes showed that a month after injection of 10⁷ cell of *V. tapetis* per clam, as in this study (cf 2.3.), the BRD prevalence was maximal (90%) and then stayed stable (Paillard and Maes, 1990). Clams were sampled again after an additional 2 weeks in the second experiment to better observe the evolution of the shell repair. In the two experiments, dead clams were also collected every day.

2.2. Bacterial strain production

For inoculation experiments, *V. tapetis* CECT4600, isolated from *R. philippinarum* in Landeda (Paillard and Maes, 1990) was grown in marine agar (1L distilled water, 15 g pastagar (AES Chemunex), 30 g sea salts (Sigma), 4 g peptone (AES Chemunex), 1 g yeast extract (AES Chemunex) and 0.1 g Fe(PO₄)₂ (Merck)) at 18 °C for 72 h before inoculation experiments.

2.3. Injection procedure

Clams were injected with 0.05 ml of SSW or with 0.05 ml of a bacterial suspension at 2 × 10⁸ cells ml⁻¹ as previously described (Paillard and Maes, 1990), and maintained in marine aquaria at 14 °C. Subsets of 100 clams of each stock were opened before injection in order to determine if clams were already affected by BRD. Each time, very few affected clams were observed. Injections were made during the first and the third generation studies (cf. 2.1.1 and 2.1.3.).

2.4. Characterisation and classification of BRD syndrome

Disease progression was monitored according to the description of Paillard and Maes (1994) following examination of shells using a binocular microscope. Four Conchiolin Deposit Groups (CDG) were considered: CDG 0 – no organic deposit detected; CDG I (early deposit, stage or CDS 1 and 2): from microscopic brown spots on the inner face of the shell to one or two zones affected by BRD deposit; CDG II (intermediate deposit, CDS3): three or four zones affected by the BRD; and CDG III (well-developed deposit, CDA to CDS7): from four zones affected by the BRD to a complete thick brown ring.

Four stages of Shell Repair or Recovery (SRS) were also determined (Paillard and Maes, 1994). Stage 1 corresponds to the apposition of calcified points. The partial covering of the deposit by wide calcified plates corresponds to stage 2. Another stage 2.5 was added after 2004 (Paillard, 2004), corresponding to an almost complete repair. In stage 3, the brown deposit is completely covered by a shell layer, forming a ridge on the inner layer or showing a brown deposit by transparency. BRD prevalence is the number of BRD-affected clams (without asymptomatic and SRS 3 clams).

2.5. Shell observations by scanning electron microscopy (SEM)

Adults of the second generation (HS2, LS2a and LS2b) collected at Landeda on September 11, 2006 and juveniles of the third generation (HS3 and LS3) from the first injection experiment were studied with a Scanning Electron Microscope HITACHI S-3200N. Observations were made on the inner face of the shell.

Shells were fixed in glutaraldehyde (2 vol. glutaraldehyde 6%, 1 vol. cacodylate buffer 0.4 M pH 7.4 and 1 vol. NaCl 7%) for 24 h and washed three times over the following 24 h in sodium cacodylate buffer (1 vol. cacodylate buffer 0.4 M pH 7.4 and 1 vol. NaCl 4%). Samples were dehydrated in a graded ethanol series (70%, 3 × 30 min; 95%, 2 × 10 min and 100%, 3 × 10 min) and dried by the critical point method. Entire juvenile valves were glued onto 2 cm diameter SEM stubs with conductive silver paint and coated with gold. Adult valves were sawed into pieces smaller than the SEM stubs before being glued.

2.6. Statistical analysis

For BRD prevalence, CDG and SRS, the non-parametric Chi-squared test was used. For a comparison using 2 × 2 tables, the Yates correction was used. Differences were considered significant at alpha = 0.05 (Table 2).

For the first generation (injection) study, data for clams in each group (LS1 and HS1) that were challenged with *V. tapetis* was compared with that of the same group challenged with SSW. Values for HS1 and LS1 clams challenged with *V. tapetis* were also compared (Table 2).

For the second generation (field) study, data for the three collection dates were pooled for each stock (HS2, LS2a and LS2b) separately and compared among groups.

For the third generation (injection) study, data from replicates were first compared. BRD prevalence, CDG and SRS of the replicates were comparable ($P > 0.05$) except for the BRD prevalence (P -value: 0.03) and the CDG of HS3 T4 (P -value < 0.0001), and the CDG of LS3 T4 (P -value < 0.0001) and T6 (P -value: 0.04). To simplify comparisons between stocks, all the replicate data were pooled (Table 2). Results of injection with *V. tapetis* were compared with SSW controls for each stock. Comparisons were then made between stocks and among collection times.

Please cite this article in press as: Trinkler, N., et al. Resistance to Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: A study of selected stocks showing a recovery process by shell repair. J. Invertebr. Pathol. (2010), doi:10.1016/j.jip.2009.12.007

Table 2

Results of Chi-squared tests comparing the different samples of *Ruditapes philippinarum* obtained on three generations in the field and by experimental challenge with *V. tapetis*. When the data were presented in a table with two columns and two lines, correction of Yates was used; BRD: Brown Ring Disease, CDG: Conchiolin Deposit Group, SRS: Shell Repair Stage; $P < 0.05$; $0.05 < P < 0.10$; $0.10 > P$.

Sample	Nb individuals/sample	Sample	Nb individuals/sample	P-value BRD prevalence	P-value CDG	P-value SRS
LS1	46	HS1	35	0,3908	0,0819	0,0009
LS2a	92/110/105	At three different dates		0,2914	0,0236	<0,0001
LS2b	51/51/52	At three different dates		0,0181	0,0015	<0,0001
HS2	50/50/51	At three different dates		0,0023	0,0083	0,0007
LS2a	193	LS2b	211	0,3221	0,7127	0,0182
LS2a	193	HS2	205	<0,0001	<0,0001	0,0004
LS2b	211	HS2	205	<0,0001	<0,0001	<0,0001
LS3 T1	30	HS3 T1	30	0,7772	0,7772	Same data
LS3 T2	30	HS3 T2	30	0,6565	0,0265	0,0700
LS3 T3	30	HS3 T3	30	0,0001	0,0002	<0,0001
LS3 T4	318	HS3 T4	310	0,0144	0,0758	<0,0001
LS3 T6	214	HS3 T6	193	<0,0001	0,0001	<0,0001
LS3 T1	30	LS3 T2	30	0,1973	0,0001	0,0700
LS3 T2	30	LS3 T3	30	0,0449	0,0753	<0,0001
LS3 T3	30	LS3 T4	318	1,0000	0,0001	<0,0001
LS3 T4	318	LS3 T6	214	0,1608	0,3564	<0,0001
HS3 T1	30	HS3 T2	30	0,0217	<0,0001	Same data
HS3 T2	30	HS3 T3	30	<0,0001	<0,0001	<0,0001
HS3 T3	30	HS3 T4	310	0,0853	<0,0001	<0,0001
HS3 T4	310	HS3 T6	193	0,8048	0,5986	0,2327

3. Results

3.1. First generation study- Low Susceptibility stock 1 versus High Susceptibility stock 1

In each case, BRD prevalence was different than in the SSW controls, but only with a 90% confidence level for LS1 (HS1: 46% compared to 9% for control and LS1: 39% compared to 26% for controls; Table 2). There was no significant difference in BRD prevalence between the two stocks (HS1 46% and LS1 39%) and no significant difference of Conchiolin Deposit Group (CDG). But, Shell Repair Stage (SRS) was significantly higher for LS1 than HS1 clams. Seventy-one percent of affected LS1 clams fell into SRS 0 compared to 100% of HS1. Furthermore, clams in SRS 2 (4%) and SRS3 (25%) were present among the LS1 (Fig. 1) (Table 2). During the experiment, mortalities cumulative mortalities after a month were greater (30%) in HS1 than in LS1: 6%.

3.2. Second generation study-Low Susceptibility stocks 2a and b versus High Susceptibility stock 2

BRD prevalence was significantly higher in the HS2 (90%) stock than in the LS2a (55%) or LS2b (47%) stocks. BRD prevalences of LS2a and LS2b stocks were not significantly different (Fig. 2a) (Table 2).

The CDG of HS2 was significantly greater than that of either LS2a or LS2b, which were not significantly different from each other. For instance, 47% of HS2 clams were in CDG 3 compared to 18% for LS2a and 15% for LS2b (Fig. 2a) (Table 2).

There was a significant difference of SRS between the stocks LS2a, LS2b and HS2. For HS2, there were more clams in stage 1 (39%) and fewer in stage 3 (9%) compared to 21% and 30% for LS2a and 21% and 51% for LS2b. The SRS of LS2b stock was significantly higher than that of the LS2a stock. For example, it had fewer clams with SRS 0 (13%) and more with SRS 3 (51%) compared to 29% and 30% for LS2a (Fig. 2b) (Table 2).

The proportion of asymptomatic clams was higher in the LS2a stock (21%) than in LS2b (4%) and in HS2 stocks (1%) (Fig. 2b) (Table 2).

The density of dead clams never exceeded 2.7 clams m^{-2} (6.3%) in each stock.

3.3. Juveniles of the third generation inoculation experiments-Low Susceptibility stock 3 versus High Susceptibility stock 3

For each date and for each stock, BRD prevalence of inoculated clams was significantly higher than SSW controls. The number of LS3 diseased individuals significantly increased with time only between the second (T2) and the third weeks (T3) (from 63% to 77%). The BRD prevalence of HS3 clams significantly rose during the first 3 weeks (50%, 67% and 97%). Prevalence of the HS3 stock was significantly higher than that of the LS3 stock from T3 on (97%, 90% and 92% for HS3, compared to 77%, 76% and 66% for LS3) (Fig. 3a) (Table 2).

The Conchiolin Deposit Group (CDG) of HS3 and LS3 stocks significantly increased with time until the fourth week (T4) (excepted LS3 between T2 and T3). After T2, there was a significant difference between LS3 and HS3 stocks. At the second week, the CDG of LS3 was significantly higher than that of HS3; for instance 10% of LS3 clams were in CDG III, whereas only 3% of HS3 were in that category. Then at T3 and T6, the CDG of LS3 was significantly lower than that of HS3.

The Shell Repair Stage (SRS) significantly increased with time after T3, except for the HS3 strain, which remained the same between T4 and T6. After T2, the SRS of LS3 was significantly higher than that of HS3. For instance, at T4, 18% of LS3 clams were in SRS 3, whereas only 2% of HS3 clams were. At T6, the values were 32% and 2%, respectively (Fig. 3b) (Table 2). The number of asymptomatic clams decreased with time and was similar in LS3 and HS3, excepted for the third week when there were more asymptomatic clams in LS3 (23%) than in HS3 stock (3%) (Fig. 3b).

The mortality was very low (from 1.2% to 9.1% in each stock).

3.4. The shell repair process examined by scanning electron microscopy

The shell repair process was followed by SEM in second generation adults (LS2a, LS2b and HS2 stocks) and in third generation juveniles (LS3 and HS3 stocks). Firstly, the structure of the inner shell of asymptomatic juveniles and adults was studied. SEM examination showed that shell zone, age and stock of clams did not influence this structure and a single example is shown (Fig. 4d). In each case, organized crystals were covered by a thin organic layer, which is transparent (Fig. 4d).

Please cite this article in press as: Trinkler, N., et al. Resistance to Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: A study of selected stocks showing a recovery process by shell repair. J. Invertebr. Pathol. (2010), doi:10.1016/j.jip.2009.12.007

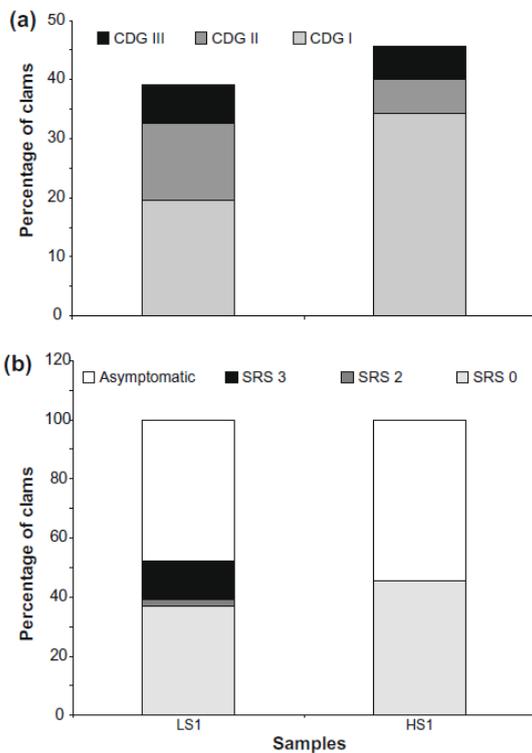


Fig. 1. Adult first generation *Ruditapes philippinarum* injected with *Vibrio tapetis* in 2002. (a) Conchiolin Deposit Group (CDG) prevalence and (b) Shell Repair Stage (SRS) prevalence and asymptomatic clams. The Brown Ring Disease (BRD) prevalence is the sum of CDGs. At each sampling $n = 50$. LS: Low Susceptibility clams and HS: High Susceptibility clams.

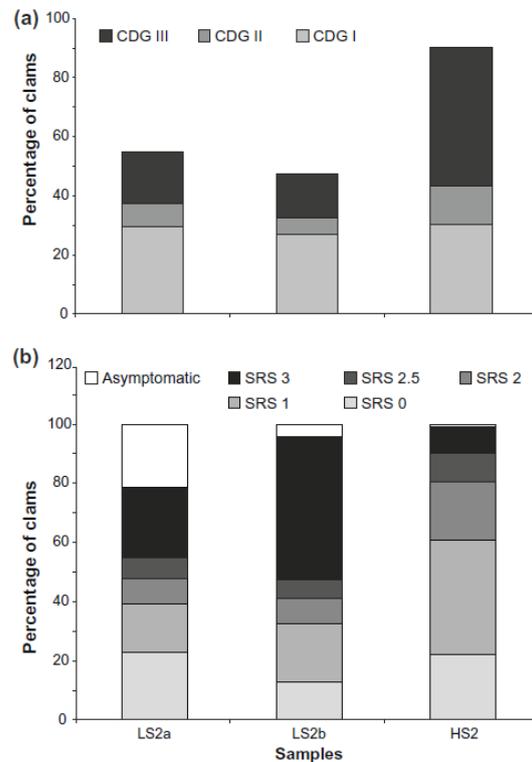


Fig. 2. Adult second generation *Ruditapes philippinarum* field tested in 2005. (a) Conchiolin Deposit Group (CDG) prevalence and (b) Shell Repair Stage (SRS) prevalence and asymptomatic clams. The Brown Ring Disease (BRD) prevalence is the sum of CDGs. At each sampling $n =$ from 50 to 110 clams. LS: Low Susceptibility clams and HS: High Susceptibility clams.

Using a binocular microscope, the beginning stages of BRD, were apparent as small brown spots on the shell and they showed no repair. SEM showed that a thick organic layer, which is opaque, was deposited on the inner layer of the shell (Fig. 5a). Bacteria were rarely visible. Observations of HS3 and LS3 shells were similar.

Subsequently white spots (SRS1), and later white plates (SRS2), were visible using a binocular microscope, on the brown layer and at SRS 2.5, the white layer had almost completely covered the brown deposit. As viewed by SEM, during the first repair phase (SRS1), a few crystal deposits were dispersed on the thick organic matrix (Fig. 5b). The density of crystals gradually increased, from small mounds to a layer extending over the brown matrix (SRS 2 and 2.5) (Fig. 5c and d). During these three stages of shell repair, crystals were disorganized and not covered by a thin organic layer, as in asymptomatic clams. These morphological appearance of these stages was similar for HS3 and LS3.

Examination of shells in SRS 3 using the binocular microscope showed that the brown conchiolin deposit was entirely covered by a white layer (Fig. 4a and b). On both LS3 and HS3 clams, SEM showed that, at the end of the repair process, the brown organic layer was totally covered by crystals, which were themselves covered by an organic layer. This organic repair layer was very different from the organic matrix of the inner layer of asymptomatic clams and from the brown organic layer of diseased clams, because it was thick, bright and smooth (Fig. 4a and b). This layer is not mineralized. By the end of the repair process, calcification seemed similar to the normal process (Fig. 4c and d).

4. Discussion

4.1. Stock selection of *R. philippinarum* against Brown Ring Disease – Study of three generations

4.1.1. Stock comparison (Low Susceptibility/High Susceptibility)

For the three studied generations, the Low Susceptibility (LS) stocks showed a greater resistance than the High Susceptibility (HS) stocks, because, in LS stocks, more clams could completely repair the shell (SRS 3) than in the HS stocks. Further, LS strains often had more asymptomatic clams than HS strains. So, some clams did not seem affected by bacterial attacks. These results were consistent with the study of Soudant et al. (2004), which showed that BRD prevalence was higher in natural stocks than in a hatchery seeded clams (LS1).

This resistance to BRD did not, however, seem to increase with generation. This may be explained by the fact that broodstock did not experience continued selection pressure, because they were maintained at a site with limited BRD problems: the Chausey Islands. Nevertheless, the resistance capacity of clams to BRD would seem heritable even though it did not increase with generation.

4.1.2. Environmental influences

It has been shown that environmental conditions influence BRD development and shell repair. The second generation collections occurred in January and February and at the Landeda site: during

Please cite this article in press as: Trinkler, N., et al. Resistance to Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: A study of selected stocks showing a recovery process by shell repair. J. Invertebr. Pathol. (2010), doi:10.1016/j.jip.2009.12.007

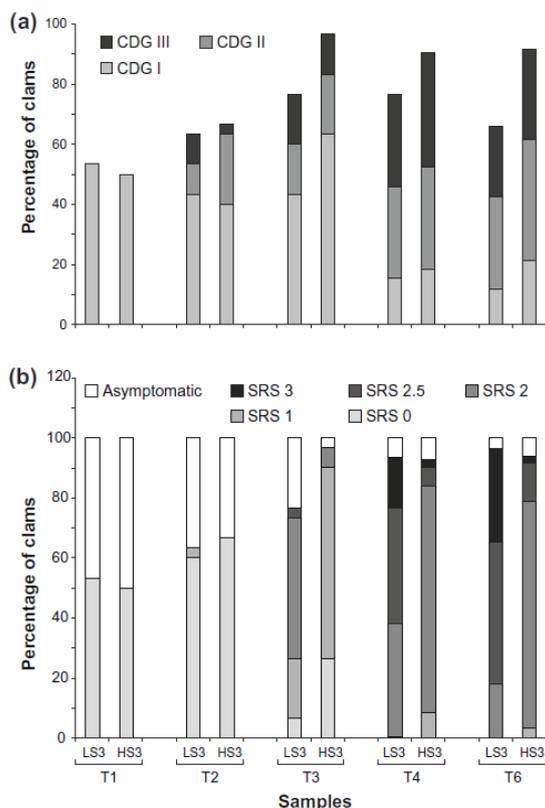


Fig. 3. Juvenile third generation *Ruditapes philippinarum* injected with *Vibrio tapetis* in 2006 and 2007. (a) Conchiolin Deposit Group (CDG) prevalence and (b) Shell Repair Stage (SRS) prevalence and asymptomatic clams. The Brown Ring Disease (BRD) prevalence is the sum of CDGs. At each sampling $n = 30$ for T1, T2 and T3, $n = 400$ for T4 and $n = 200$ for T6. T: time, LS: Low Susceptibility clams and HS: High Susceptibility clams.

a period and at a site favourable for high development of BRD. In this study, after 2 months in this site, the BRD prevalence of the HS stock was 90%. It was very close to the BRD prevalence measured in the HS3 clams 1 month after injection of 10^7 CFU/individual of *V. tapetis* in the pallial cavity.

Brown Ring Disease had been investigated for 15 years before the present study. In it, we observed that selected clams of three generations attained a more advanced Shell Repair Stage following natural exposure in the field or experimental infection in the laboratory than any previously observed during these 15 years. Indeed, at the Landeda field site, in January and February 1988, during the first recognized BRD epizootic, only SRS 1 was observed (Paillard and Maes, 1994). In contrast, LS2a and LS2b clams exposed on the same site in 2005 displayed repair stages (SRS) 2, 2.5 and 3. At 14 °C, a month after experimental injection, Paillard et al. (2004) showed a percentage of SRS 3 of 5–10%, similar to that of the HS stocks in the two injection experiments studies here, compared to LS1 (25%) and LS3 (18%). In non-selected clams, the shell repair process is reduced at low temperature (lower at 14 °C and 8 °C than at 21 °C) (Paillard et al., 2004). In contrast, as shown by the second generation field study, even at low temperature, the process of shell repair in LS stocks appears to occur at a high level.

4.2. Shell repair

4.2.1. Shell resistance mechanisms

In bivalves, some shell repair processes have been described according to the type of pathogen or parasite attacks, i.e. blisters, attached pearls, brown deposit syndrome (Cheng, 1967; Jameson, 1902; Paillard et al., 1994). In their response to *V. tapetis* infection, Manila clams present two successive steps in the external defence system. Firstly, bacteria are embedded in a conchiolin deposit. Secondly, the deposit is covered by a repaired shell layer (Paillard et al., 1994).

Conchiolin deposits, like the BRD deposit, have been reported in several bivalve species after infection by trematodes like *Tapes aurea* with *Meiogymnophalus fossarum* (Bartoli, 1974) or by bacteria like *Crassostrea virginica* (juvenile oyster disease) with *Roseovarius crassostreae*, and after summer mortalities for *C. virginica* (Bricelj et al., 1992; Ford and Borrero, 2001; Maloy et al., 2007; Renault et al., 2002).

The general process of coating a pathogen with a shell matrix has been described, particularly with respect to pearls, and covering of trematodes like *Gymnophallus margariferum* and polychaetes like *Polydora* spp. (Cheng, 1967). In fact, pearl formation in pearl oysters *Pinctada* sp., is a mechanism of foreign-body eroding with a nacre shell layer (Arnaud-Haond et al., 2007). The shell repair of the Manila clam after a *V. tapetis* attack one of the rare cases of a shell repair process after a bacterial infection.

4.2.2. Conclusions about shell repair using SEM

The brown organic matrix deposit was previously described using SEM (Paillard and Maes, 1995a,b). But, we have for the first time described the shell repair mechanism of *R. philippinarum* in BRD recovery by using SEM. In the normal inner-shell layer, which has a homogeneous structure (Boggild, 1930; Shimamoto, 1986), the organized crystals are covered by a thin and transparent organic layer. At the onset of BRD, a brown, thick and opaque organic layer, which was different than the thin one, was deposited onto the inner layer. Then, during the repair, calcium crystals were progressively deposited until the affected zone was entirely covered. At the end of the shell repair process, a final organic layer covered the calcium crystals mounts. This layer is opaque, quite thick, bright, smooth and not mineralized. This matrix seemed essential for recovery and was very different to the two first organic layers.

Our results show that recovery entails total shell repair (SRS 3) and suggest that an organic repair layer is essential for the completion of this process. This result was not surprising because many studies have demonstrated that an organic matrix plays an important structural role in calcification, particularly with bivalves (Dauphin, 2000; Dauphin and Denis, 2000; Marin and Luquet, 2004; Marin et al., 2008).

4.3. Resistance – just due to shell repair?

Resistance may be a complex feature, dependent upon the development of various physiological processes. We observed two phenomena: some clams did not develop disease after contact with *V. tapetis*, while others did, but were able to recover, displaying a total shell repair. This could illustrate that two complementary resistance processes occur, both of which could have a genetic origin.

In the literature, it has been shown that families of disease-resistant bivalves may be selected, because this resistance can be heritable. For example, since 1997, Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*) have been selected to resist the protistan parasite *Marteilia sydneyi*. Resistant populations had a better phenoloxylase activity than unselected ones, because they had a negative selec-

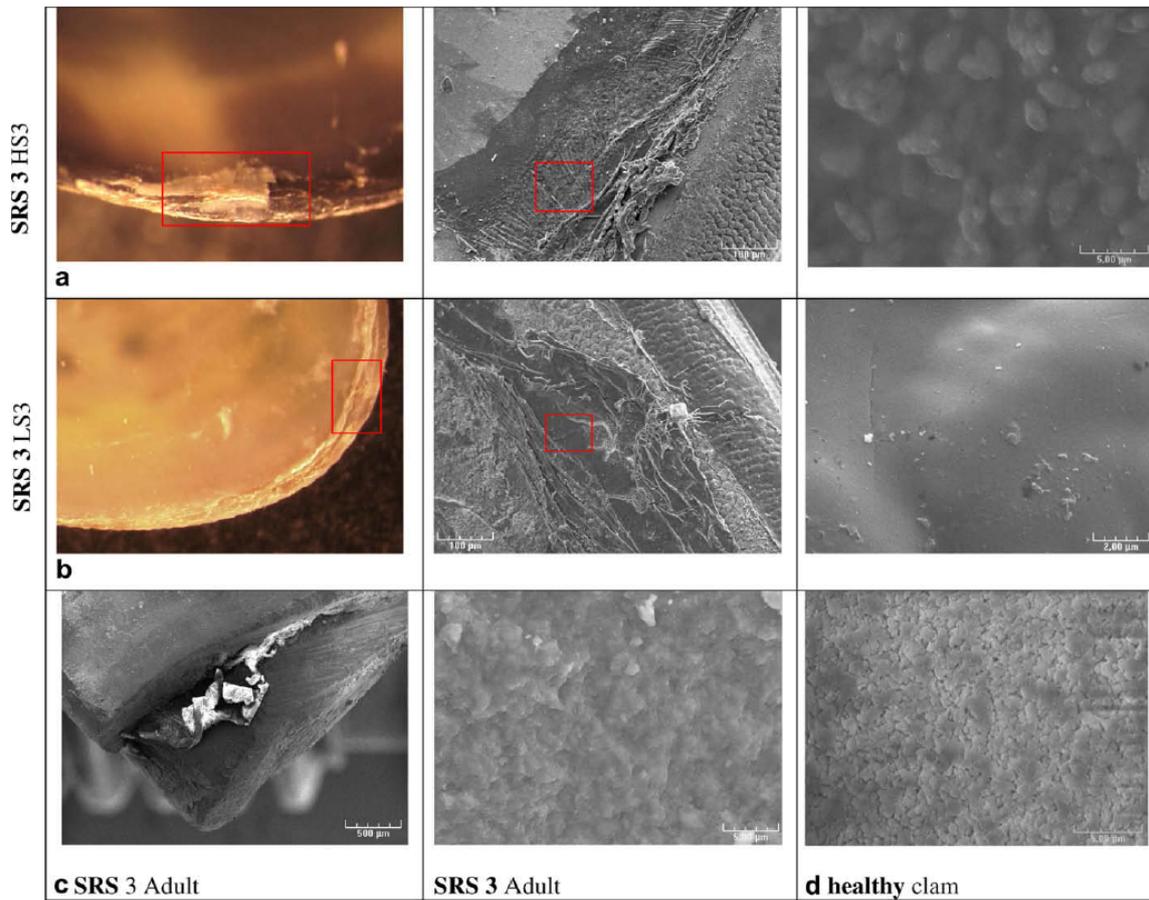


Fig. 4. Binocular microscope (first column) and SEM (second and third columns) views of the inner surface of shells with a Shell Repair Stage (SRS) 3, (a) HS3 J T4, (b) LS3 J T4, (c) HS2 A and (d): HS3 J T0. T0: before the inoculation, T4: 4 weeks after the inoculation, J: juvenile, A: adult, HS3: High Susceptibility clam of the third generation, LS3: Low Susceptibility clam of the third generation, HS2: High Susceptibility clam of the second generation.

tion against a form of phenoloxdase PO^b (Bezemer et al., 2006; Newton et al., 2004).

Furthermore, survival of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in the face of summer mortality was followed during four generations. This trait presented high heritability (Boudry et al., 2007). In 1996, Gaffney and Bushek reviewed the influence of genetic variation in resistance of *Crassostrea* spp. to diseases caused by *Perkinsus marinus* and *Haplosporidium nelsoni*. They particularly showed that intraspecific variations in *C. virginica* and interspecific variations between *C. virginica* and *C. gigas* were important influences on disease resistance (Gaffney and Bushek, 1996). In 1996, Bushek and Allen indicated that some populations of *C. virginica* were more resistant to *P. marinus* than others, including oysters from Texas and Virginia that had been exposed to *P. marinus* for more than 40 years (Bushek and Allen, 1996).

Resistance of oysters to *Haplosporidium nelsoni*-caused mortality was also studied in field trials (Delaware Bay) from 1964 to 1979. This resistance was heritable and increased between generations (Haskin and Ford, 1979). Subsequently, *Crassostrea virginica* were selected over four generations for resistance against the diseases caused by the two parasites: *H. nelsoni* and *P. marinus*. This resistance was also heritable (Ragone Calvo et al., 2003).

In conclusion, it seems that hatchery-reared stock originally used by Soudant et al. (2004) in their field study may have experienced prior selection by BRD or by chance, as the result of genetic drift during hatchery production, have contained a significant proportion of clams with traits for resistance to BRD. The process of a complete shell repair was certainly due to the ability of the clams to produce the final repair matrix. In addition, it is also possible that some clams have some immunological parameters that allow them to withstand infection and ultimately repair and recover. It was has been suggested that the immune system may play a role in the resistance of the Manila clams to BRD. In 2001, Allam et al., observed that different populations of *R. philippinarum* (from France and from USA) and *R. decussatus* (from France) developed different BRD level after the same experimental challenge. This difference seemed to be associated with the capacity of the immune system, because it was correlated with granular haemocytes concentration and the phagocytic activity of haemocytes in haemolymph and in the extrapallial spaces which is the infection site (Allam et al., 2001).

Haemocytes could equally well play a role in the shell repair process. Holes drilled in Manila clams shells and sealed with pieces of sterile coverslips were covered with hemocytes within a few days after inoculation with *V. tapetis* (Allam, 1998).

Please cite this article in press as: Trinkler, N., et al. Resistance to Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: A study of selected stocks showing a recovery process by shell repair. J. Invertebr. Pathol. (2010), doi:10.1016/j.jip.2009.12.007

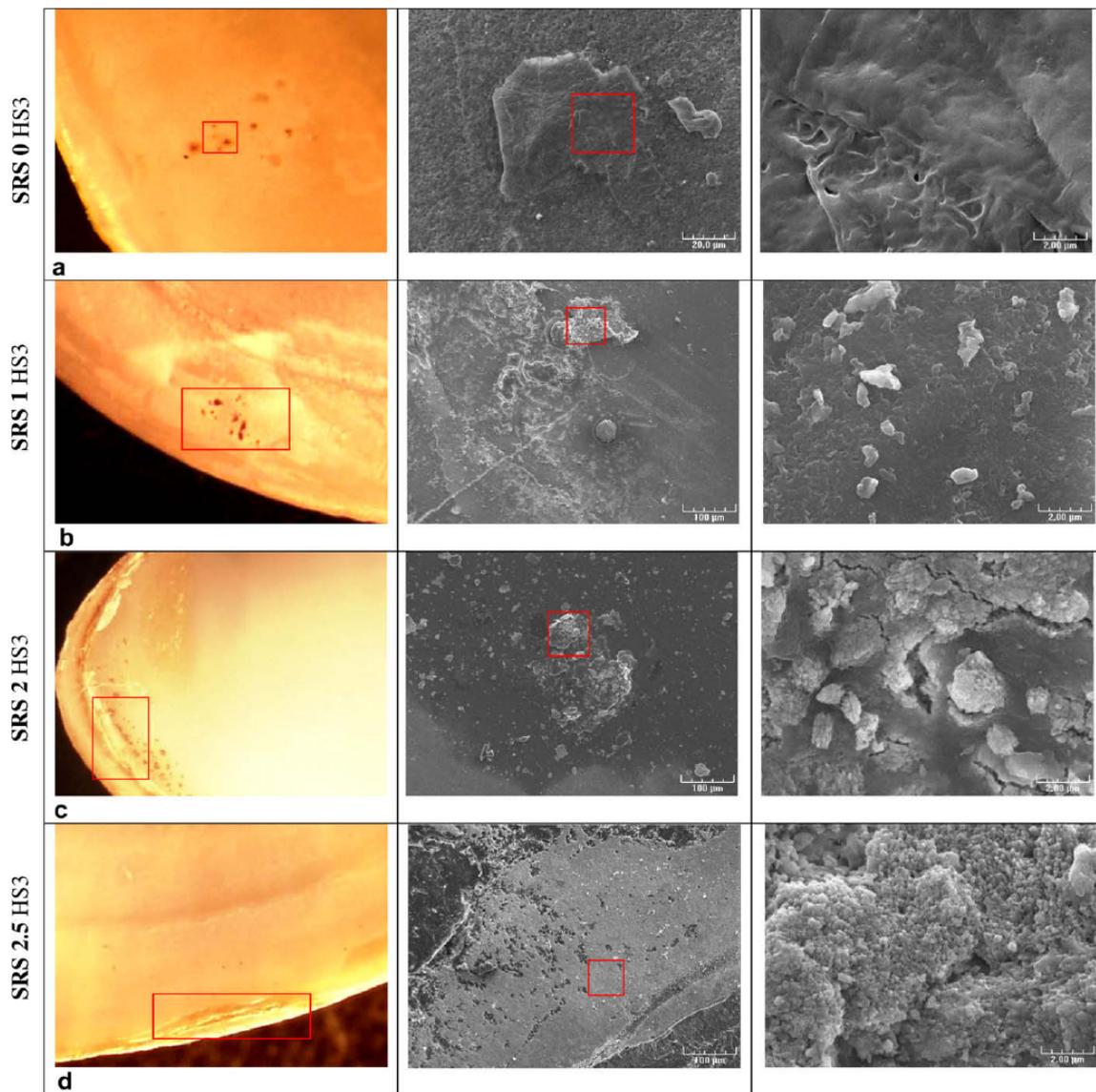


Fig. 5. Binocular microscope (first column) and SEM (second and third columns) views of the inner surface of juvenile shells with a Shell Repair Stages (SRS) 0, 1, 2 and 2.5, (a) HS3 T1, (b) HS3 T3 (c) HS3 T4 and (d) HS3 T4, T1: 1 week after the inoculation, T3: 3 weeks after the inoculation, T4: 4 weeks after the inoculation, HS3: High Susceptibility clam of the third generation, LS3: Low Susceptibility clam of the third generation.

The availability of stocks resistant to BRD is economically very important for aquaculturists. Furthermore, the selected stocks showed good spawning and high larval quality. Because, BRD affects the growth and the reproduction of clams (Flye-Sainte-Marie et al., 2007), resistant clams should have better growth than susceptible clams when challenged by *V. tapetis* in the field.

Resistant-family selection (one male × one female) and genetic analysis are in progress using the third generation resistant clams. Furthermore, with the aim of understanding the shell repair process in detail, different tools will be used, including RAMAN micro-spectrometry, wavelength dispersive spectrometry microprobe and proteomic techniques.

Acknowledgments

We would like to thank Nelly Le Goïc and Adeline Toffin for technical assistance, Susan Ford and Stein Mortensen for manuscript corrections, SATMAR (France) for production of juvenile clam and their help on clam deployment, Fred Jean and Jonathan Flye-Sainte-Marie for seed, Sabrina Gausson for inoculation tests, Monique Briand for the figures and the ARN multistress for financing.

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.

Please cite this article in press as: Trinkler, N., et al. Resistance to Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: A study of selected stocks showing a recovery process by shell repair. J. Invertebr. Pathol. (2010), doi:10.1016/j.jip.2009.12.007

- Ruditapes philippinarum*. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, p. 204.
- 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.
- 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*. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 63–69.
- Arnaud-Haond, S., Goyard, E., Vonau, V., Herbaut, C., Prou, J., Saulnier, D., 2007. Pearl formation: persistence of the graft during the entire process of biomineralization. *Mar. Biotechnol.* 9, 113–116.
- Bartoli, P., 1974. Recherche sur les *Gymnophallidae* F.N. Morozov, 1955 (Digenea), parasites d'oiseaux des côtes de Camargue: systématique, biologie et écologie, Thèse de Doctorat. Université d'Aix Marseille.
- Bezemer, B., Butt, D., Nell, J., Adlard, R., Raftos, D., 2006. Breeding for QX disease resistance negatively selects one form of the defensive enzyme, phenoloxidase, in Sydney rock oysters. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 627–636.
- Boggild, O.B., 1930. The Shell Structure of the Mollusks. Mémoire de l'Académie Royale des sciences et des Lettres du Danemark, 9^{ème} série, Copenhague.
- Borrego, J.J., Castro, D., Luque, A., Paillard, C., Maes, P., Garcia, M.T., Ventosa, A., 1996. *Vibrio tapetis* sp. nov. the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 480–484.
- Boudry, P., Dégremont, L., Haffray, P., 2007. Etudes des bases génétiques de la mortalité estivale du naissian et des possibilités d'amélioration de la survie par sélection. In: Samain, J.F., McCombie, H. (Eds.), *Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, Défi Mores*. Quae, Versailles, pp. 141–183.
- Breber, P., 1985. L'introduzione e l'allevamento in Italia dell'arsella del Pacifico, *Tapes semidecussatus* reeve (Bivalvia, Veneridae). *Oebelia* 11, 153–159.
- Bricelj, V.M., Ford, S.E., Borrego, J.J., Perkins, F.O., Rivara, G., Hillman, R.E., Elson, R.A., Chang, J., 1992. Unexplained mortalities of hatchery-reared, juveniles oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shellfish Res.* 11, 331–347.
- Bushek, D., Allen, S.K.J., 1996. Host-parasite interactions among broadly distributed populations of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and the protozoan *Perkinsus marinus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 139, 127–141.
- Cheng, T.C., 1967. Internal defense mechanisms. *Adv. Mar. Biol.* 5, 60–80.
- Dauphin, Y., 2000. Comparison of the soluble organic matrices of healthy and diseased shells of *Pinctada margaritifera* (L.) and *Pecten maximus* L. (Mollusca, Bivalvia). *J. Invertebr. Pathol.* 76, 49–55.
- Dauphin, Y., Denis, A., 2000. Structure and composition of the aragonitic crossed lamellar layers in six species of Bivalvia and Gastropoda. *Comp. Biochem. Physiol.* 126 A, 367–377.
- Flassch, J.P., Barret, J., Mazurie, J., Maes, P., Nicolas, J.L., Noel, T., Paillard, C., Le Pennec, M., 1992. L'élevage de la palourde, programme national de recherche sur la maladie de l'anneau brun. In: Ifremer (Ed.), *Les mollusques marins Biologie et aquaculture*, vol. 14. Ifremer, Brest, pp. 127–140.
- Flassch, J.P., Leborgne, Y., 1992. Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese manila clam (*Tapes philippinarum*) and effects on aquaculture production and natural settlement. In: ICES (Ed.), *ICES Mar. Sci.*, vol. 194. ICES, Halifax, pp. 92–96.
- Flye-Sainte-Marie, J., 2007. Approche écophysiological de la Maladie de l'Anneau Brun chez la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*: expérimentations et modélisation, Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, p. 144.
- 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.
- Ford, S.E., Borrero, F.J., 2001. Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 78, 141–154.
- Gaffney, P.M., Bushek, D., 1996. Genetic aspects of disease resistance in oysters. *J. Shellfish Res.* 15, 135–140.
- Goulletquer, P., 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850), vol. 2009. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_philippinarum/en>.
- Haskin, H.H., Ford, S.E., 1979. Development of resistance to *Minchinia nelsoni* (MSX) mortality in laboratory-reared and native oyster stocks in Delaware Bay. *Mar. Fish. Rev.* 41, 54–63.
- Jameson, L.H., 1902. On the origin of pearl. *Trans. Zool. Soc. Lond.*, 140–166.
- Lewis, E.J., Farley, C.A., Small, E.B., Baya, A.M., 1996. A synopsis of juvenile oyster disease (JOD) experimental studies in *Crassostrea virginica*. *Aquat. Living Resour.* 9, 169–178.
- Maloy, A.P., Ford, S.E., Karney, R.C., Boettcher, K.J., 2007. *Roseovarius crassostreae*, the etiological agent of juvenile oyster disease (now to be known as *Roseovarius* oyster disease) in *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 269, 71–83.
- Marin, F., Luquet, G., 2004. Molluscan shell proteins. *C.R. Palevol.* 3, 469–492.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., Medakovic, D., 2008. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Curr. Top. Dev. Bio.* 80, 209–276.
- Newton, K., Peters, R., Raftos, D., 2004. Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Dev. Comp. Immunol.* 28, 565–569.
- 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.
- Paillard, C., Allam, B., Oubella, R., 2004. Effect of temperature on defense parameters in manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* 59, 249–262.
- Paillard, C., Percelay, L., Le Pennec, M., Le Picard, D., 1989. Origine pathogène de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). *C. R. Acad. Sci. Paris* 309, 235–241.
- Paillard, C., Maes, P., 1990. Etiology of the brown ring disease in *Tapes philippinarum*: pathogenicity of a *Vibrio* sp. *C.R. Acad. Sci. Paris* 310, 15–20.
- Paillard, C., Maes, P., 1994. Brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. *Dis. Aquat. Org.* 19, 137–146.
- Paillard, C., Maes, P., 1995a. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 91–100.
- Paillard, C., Maes, P., 1995b. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: II. Microscopic study of the brown ring syndrome. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 101–110.
- 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: AEEMA (Ed.), 8th Symp. Int. Soc. Veterinary Epidemiology and Economics. AEEMA, Paris, France, pp. 14031–14033.
- Paillard, C., Maes, P., Oubella, R., 1994. Brown ring disease in clams. *Ann. Rev. Fish Dis.* 4, 219–240.
- Ragone Calvo, L.M., Calvo, G.W., Bureson, E.M., 2003. Dual disease resistance in a selectively bred eastern oyster, *Crassostrea virginica*, strain tested in Chesapeake Bay. *Aquaculture* 220, 69–87.
- Renault, T., Chollet, B., Cochenec, N., Gerard, A., 2002. Shell disease in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, reared in France. *J. Invertebr. Pathol.* 79, 1–6.
- Shimamoto, M., 1986. Shell microstructure of the Veneridae (Bivalvia) and its phylogenetic implications. *Tohoku Univ. Sci. Rep.* 2nd ser. 56, 1–39.
- Soudant, P., Paillard, C., Choquet, G., Lambert, C., Reid, H.L., Marhic, A., Donaghy, L., Birnbeck, 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.

Chapitre 3. La phase minérale de la réparation coquillière chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* affectée par la Maladie de l'Anneau Brun : une étude utilisant la micro-spectrométrie Raman confocale, le microscope électronique à balayage et une coloration des cellules hémocytaires

Article 2: Mineral phase in the shell repair in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affected by the Brown Ring Disease: a Raman micro-spetrometry, scanning electron microscopy and hemocyte cellular study

Le chapitre précédent nous avait montré que la réparation coquillière était un des principaux processus impliqués dans la résistance de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* face à la MAB. Ce travail avait également mis en évidence que la microstructure de la couche coquillière de réparation était différente de celle de la couche interne saine (article 1). Par ailleurs, il est reconnu que la coquille des mollusques est constituée de deux composants : la partie minérale 95% (w/w) et la partie organique 5% (w/w).

Le but du chapitre 3 est de caractériser et de comprendre le processus de réparation coquillière à différentes échelles et à différents stades de réparation en se focalisant sur la partie minérale. A cette fin, trois techniques expérimentales ont été utilisées. La micro-spectrométrie Raman confocale et le Microscope Electronique à Balayage (MEB) ont montré que des microstructures aragonitiques quadrangulaires et sphérulitiques associées avec des pigments polyènes étaient clairement observables.

La coloration Von Kossa a montré qu'au début de la réparation coquillière, les hémocytes étaient chargés avec des sels insolubles de carbonate de calcium dans tous les fluides : hémolymphe, fluide extrapalléal interne et fluide extrapalléal périphérique. Ces hémocytes sont ensuite transportés vers les fluides extrapalléaux et les sites de réparation.

Chapitre 3

Notre analyse suggère qu'après une attaque de *V. tapetis* et l'apparition du dépôt brun, quelques palourdes recouvrent rapidement le dépôt en produisant une couche calcifiée avec une microstructure modifiée. Ces modifications pourraient à la fois provenir de la mobilisation des hémocytes chargés en sels insolubles de carbonate de calcium ainsi que d'un changement dans le régime sécrétoire des cellules du manteau. De plus, comme ces modifications ne s'expliquent pas par la nature du polymorphe de carbonate de calcium, la matrice organique coquillière de la couche de réparation va être étudiée dans la suite de cette thèse.

Un article traitant de cette étude a été soumis dans le journal *Diseases of aquatic organisms* en 2010.

Title: Mineral phase in the shell repair in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affected by the Brown Ring Disease: a Raman micro-spectrometry, Scanning Electron Microscopy and hemocyte cellular study.

Running head: Mineral phase in a shell repair

Authors and addresses: Nolwenn Trinkler¹, Jean-François Bardeau², Frédéric Marin^{3,4}, Maylis Labonne^{5,*}, Aurélie Jolivel⁶, Philippe Crassous⁶, Christine Paillard¹

¹ IUEM, LEMAR, UMR CNRS/UBO/IRD 6539, Technopole Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

² LPEC, UMR CNRS 6087, Université du Maine, 72085 Le Mans Cedex 9, France

³ UMR CNRS 5561 Biogéosciences, Dijon, France

⁴ Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France

⁵ IRD, LEMAR, UMR CNRS/UBO/IRD 6539, Centre IRD Bretagne, BP 70, 29280 Plouzané, France

⁶ Ifremer, STH, Z.I. Pointe du diable, BP 70, 29280 Plouzané, France

*Corresponding author: Maylis Labonne, E-mail address: maylis.labonne@ifremer.fr, Tel.: +33-2-98-22-45-04, Fax: +33-2-98-22-45-14

ABSTRACT

The mineral phase of the shell repair in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affected by the Brown Ring Disease was characterized at different scales and at different stages of shell repair by confocal Raman micro-spectrometry and Scanning Electron Microscopy. Spherulitic and quadrangular aragonite microstructures associated with polyene pigments was clearly observed. The Von Kossa staining showed that at the beginning of shell repair, hemocytes are filled with insoluble calcium carbonate salts in all fluids and then are transported toward the extrapallial fluids and the repair sites. Our analyses suggest that after a *V. tapetis* attack and BRD deposit some clams rapidly cover the deposit, resulting in a modification in the microstructure which could be produced by the participation of both the mantle and hemocytes.

KEY WORDS: aragonite, hemocytes, shell microstructure, calcium carbonate, biomineralization, mollusc

INTRODUCTION

In marine biota, invertebrates are constantly submitted to external environmental aggressions. These aggressions can be of physico-chemical nature, such as desiccation, UV, accidental cracks, or of biological nature, such as predation or competition for space. During evolution, a majority of sedentary invertebrates have acquired the capacity to develop a mineralized exoskeleton to protect themselves against these aggressions. In addition, their exoskeleton supports their soft-bodies (Simkiss & Wilbur 1989). In molluscs, the protective exoskeleton is the shell, which is mainly composed of calcium carbonate. The calcium carbonate of the molluscan shells can be formed by aragonitic crystals such as that of *Mercenaria mercenaria* (Taylor *et al.* 1973), calcitic crystals such as in *Crassostrea virginica* (Carriker 1996) or sometimes vaterite crystals such as in freshwater cultured pearls of *Hyriopsis cumingii* and *H. schlegeli* (Jacobs *et al.* 2008).

The Manila clam *Ruditapes philippinarum* is a heterodonte bivalve of economical importance. Its valves are constructed by the superimposition of two aragonitic layers (Taylor *et al.* 1973). The inner layer is described as “homogeneous” while the outer layer is a “composite prismatic” structure (Boggild 1930, Shimamoto 1986). As in other Venerideae, the attachment of the mantle to the shell along the pallial line separates the extrapallial space in to two compartments, which contain the central and the peripheral extrapallial fluids (Allam & Paillard 1998, Gosling 2003).

In Europe, this clam is regularly affected by a pathological condition named Brown Ring Disease (BRD). This disease, which is associated with the presence of a brown deposit on the inner surface of the valves, is caused by the bacterium *Vibrio tapetis* (Paillard & Maes 1990). This disease was first recognized in 1987, when mass mortalities of cultured Manila clams were recorded in Landeda (Brittany) north Finistère. Landeda was the first production site in France (Paillard *et al.* 1989, Flassch *et al.* 1992).

Vibrio tapetis colonizes the periostracum and inhibits the normal process of shell biomineralization. The external response of the clam to the bacterial attack consists in the secretion of a brown organic matrix on the inner face of the shell, the well-known ‘brown ring’. Immunological or PCR studies on the different physiological fluids of the clam have shown that, at later stages of the infection, *V. tapetis* invades the circulatory system (hemolymph) and the extrapallial fluids (Allam 1998, Allam *et al.* 2002, Paillard *et al.* 2006). At this advanced stage, clams often die from a hemolymphatic septicaemia. In some cases,

clams recover by secreting a white shell layer on the brown organic matrix (Paillard & Maes 1995a, b). The organic matrix associated with the shell repair has been recently characterized using Raman micro-spectrometry, WDS microprobe analysis and organic matrix quantifications (Trinkler *et al.* 2009a, Trinkler *et al.* 2010). On the other hand, the mineral phase and the microstructure of repaired Manila clam shells - especially the ones which exhibit a fully repaired shell - has not yet been studied. In the present work, experimental investigations are performed on the microstructure and the nature of the calcium carbonate repair layer, using Raman micro-spectrometry and Scanning Electron Microscopy (SEM). A complementary approach using the Von Kossa stain in hemolymph and extrapallial fluids reveals the presence of insoluble salts of calcium carbonate in hemocytes. These techniques applied on BRD affected and non-BRD-affected clams bring valuable information on the mineral phase. Raman micro-spectrometry, which is a non-destructive and non-invasive technique, provides qualitative and quantitative analysis of numerous mineral and organic compounds. This tool was intensively used to identify the polymorph of calcium carbonate (aragonite, calcite, vaterite, monohydrocalcite, dolomite, amorphous calcium carbonate). In previous studies, it has been used to characterize the polymorphs of calcium carbonate on synthetic calcium carbonate crystals (Kontoyannis & Vagenas 2000, Carteret *et al.* 2009) and on molluscan shells (Urmos *et al.* 1991, Weiss *et al.* 2002, Gotliv *et al.* 2003, Withnall *et al.* 2003, Lécuyer *et al.* 2004, Brink & Van Der Berg 2005, Rousseau *et al.* 2005, Hedegaard *et al.* 2006, Jing *et al.* 2007, Yan *et al.* 2007, Jacobs *et al.* 2008, Takeuchi *et al.* 2008), but never for the Manila clam, nor for analyzing a shell repair process. SEM is commonly used to provide morphological and structural information on the microstructure of the shell. Only a few SEM studies have been performed on non-BRD-affected shells of the Manila clam (Taylor *et al.* 1973, Shimamoto 1986, Popov 1992, Paillard & Le Pennec 1993, Fujikura *et al.* 2003) and clams affected by BRD (Paillard *et al.* 1994, Paillard & Maes 1995a, b, Trinkler *et al.* 2009b). Finally, Von Kossa staining is a classical method employed for revealing insoluble calcium salts in bone and osteoblasts. It has been used on molluscan tissues only in few studies, particularly for the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Renault *et al.* 2002) and also for analyzing shell repair of the abalone *Haliotis tuberculata* after an artificial perforation (Fleury *et al.* 2008).

MATERIALS AND METHODS

Clam sampling

Adult Manila clams *Ruditapes philippinarum* (25-35 mm) were collected in Landeda site (Brittany, France) on 23 April 2007. Most of them exhibited a brown ring (Paillard & Maes 1994). Juvenile specimens (10-16 mm) were provided by the SATMAR nursery (Marennes, France) on 3 May 2007. Shells were systematically opened, emptied of soft tissue using a scalpel and rinsed with tap water before determine the stage of BRD on the inner face of the valves using standard binocular microscopy. The Shell Repair Stages (SRS) were determined according to previous studies, which evidenced five stages (Paillard & Maes 1994, Paillard 2004). Stage 0 corresponds to a brown deposit without repair. Stage 1 corresponds to the apposition of calcified points. The partial covering of the deposit by wide calcified plates corresponds to Stage 2. The stage 2.5 corresponds to an almost complete repair. In Stage 3, the brown deposit is completely covered by a fully calcified layer (Table 1).

Shell Repair Stages (SRS)	Non-BRD-affected clam	SRS 0	SRS 1
Description	Homogenous inner layer	Brown deposit without repair	Brown deposit with points of repair
Figure			
Shell Repair Stages (SRS)	SRS 2	SRS 2.5	SRS 3
Description	Brown deposit with plates of repair	Almost total repair	Total repair
Figure			

Table 1: Examples of the shell repair stages (SRS) of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* after a BRD attack (Querne 2005).

RAMAN micro-spectrometry

Raman micro-spectrometer

We used a Raman micro-spectrometer (T64000, Horiba-Jobin-Yvon) equipped with a confocal system, a motorized xy-stage and a coherent spectrum argon/krypton ion laser emitting at 51435 nm. The laser was focused onto the sample using a microscope equipped with a $\times 100$ objective; the resulting spatial resolution was about 1 μm . The scattered light was then analysed using a single monochromator (600 gratings mm^{-1}), coupled to a nitrogen-cooled CCD detector. For each sample, parameters were adjusted thusly: laser power (varying from 30 to 50 mW), spectra accumulation (from 2 to 30 times) and exposure time (from 1 to 60 s) (Table 2). Measurements were systematically made at 2 μm depth and sometimes on fresh breaks to avoid surface contamination. Reported Raman spectra were normalized by dividing intensity by acquisition time (s) and laser power (mW). The peak positions and the relative integrated intensities of identifiable vibrational bands and luminescence were determined using the LABSPEX software.

Samples	Analysis	Parameters		
		Acquisition time (s)	Laser power (mW)	accumulation times
A1	surface analysis	30-50	30	2-4
J1		35	30	2
J2		50	30	2
2 clams SR0		1	30	10
2 clams SR1		1	30	10-30
1 clam SR2		2	30	30
2 clam SR3		4	30	30
A2	Edge analysis	40	30	2
J3		30-40	50	2
One non-BRD-affected adult	Polyene analysis	30-60	50	2
Five SRS 3 adults		2-50	30-40	2-10

Table 2: Samples and parameters used for Raman analysis, A: Adult, J: Juvenile

Samples analyzed using Raman micro-spectrometry

Raman analysis was first carried out on the internal surface of a non-BRD-affected adult (A1) in five regions of the right valve: central zone, peripheral anterior zone, peripheral posterior zone, peripheral ventral zone and siphonal zone. Raman spectra were also acquired

on the internal surface of four juveniles. Similar results were obtained with the 4 shells so only two of them are presented in Figure 3 (J1: left valve, peripheral ventral zone, J2: left valve, central zone). In addition, we compared the spectra obtained from the inner and the outer shell layers from two shells (one adult A2 and one juvenile J3) after having cut both of them with cutting pliers to avoid aragonite/calcite thermal transformation.

Subsequently, we studied adult clams affected by the BRD. For each SRS, analyses were made on surface of shell, in the aim to characterize the evolution of the Raman signal during the shell repair (2 clams with SRS 0, 2 with SRS 1, 1 with SRS 2 and 2 with SRS 3).

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Inoculation

Vibrio tapetis CECT 4600, isolated from *R. philippinarum* in Landeda (Paillard & Maes 1990) was grown in marine agar (1L distilled water, 15 g pastagar [AES Chemunex], 30 g sea salts [Sigma], 4 g peptone [AES Chemunex], 1 g yeast extract [AES Chemunex] and 0.1 g Fe(PO₄)₂ [Merck]) at 18°C for 72 h before inoculation. Then, *V. tapetis* was resuspended in sterile sea water (SSW).

Two hundred juvenile clams, from a low susceptibility stock from the SATMAR farm (Trinkler *et al.* 2009b) were injected in the pallial cavity with 0.05 ml of SSW and 200 others with 0.05 ml of a solution containing *V. tapetis* at 2×10^8 cells.ml⁻¹ as previously described (Paillard & Maes 1990). The clams were maintained in marine aquaria at 14°C. A low susceptibility stock of clams was chosen for their capacity to repair their shell (a higher SRS) (Trinkler *et al.* 2009b). After 6 weeks, clams were sampled and their SRS was characterized (Table 1).

Sample preparation for SEM

Using a SEM QUANTA 200 (FEI), observations were made on the inner valve surface of non-BRD-affected and experimentally diseased shells. The outer layer was visible on the edge of the shell. BRD-affected and non-BRD-affected zones were cut out with a scalpel. Fragments from two shells of non-BRD-affected clams and from two shells of each SRS (0, 1, 2, 2.5 and 3) were soaked in ethanol 70% for 2h, rinsed with distilled water, and dried at 37°C. Then, non-BRD-affected and repaired fragments were soaked in sodium hypochlorite solution (0.027 % active chlorine for 2 h) to remove the organic phase and isolate the mineral

phase. As the brown deposit is entirely organic (Trinkler *et al.* 2009b, Trinkler *et al.* 2010), clams at SRS 0 were not soaked in sodium hypochlorite solution. The fragments were rinsed with distilled water, dried at 37°C and glued on SEM stubs with conductive silver paint and coated with gold, using a cathodic spray SCD 040 (Blazers Union).

Von Kossa stain

Fluids collecting

The hemolymph, the Peripheral Extrapallial Fluid (PEF) and the Central Extrapallial Fluid (CEF) were collected from 30 adult clams whose SRS was also characterized (9 non-BRD-affected, 1 SRS 0, 1 SRS 1, 14 SRS 2, 2 SRS 2.5 and 3 SRS 3, following table 1). The hemolymph was collected from the posterior adductor muscle sinus with a 1-ml hypodermic syringe (25 G needle) through the ligament at the base of the umbo (Oubella *et al.* 1993). Extrapallial fluids were collected, by slipping a 21 G needle attached to a 1-ml syringe between the shell and the mantle after the opening of the valves by cutting the adductor muscles. This allowed the pallial fluid to drain away as described in Allam and Paillard (1998). PEF was collected into the pallial muscle and the sinus, and CEF into the mantle, in the central compartment, between the pallial line and the sub-articular compartment.

Fluids were individually centrifuged with a cytospin (10 min, 28 g) onto glass slides to achieve hemocyte monolayers (150µl of fluid per glass slides). Three glass slides per sample and per fluid type were made when it was possible. Then, glass slides were air-dried and conserved in the dark.

Von Kossa staining

The Von Kossa method stains insoluble salts of calcium phosphate and calcium carbonate. The staining was performed according to the following standard procedure (Gabe 1968) : 10 min incubation in 5% (w/v) of silver nitrate in H₂O in the dark, two washes with distilled water (2x10 min) for removing the excess silver nitrate, staining with 0.5% (w/v) of hydroquinone in H₂O for 2 min in the daylight, a wash with distilled water (10 min), an incubation with sodium thiosulfate (5%, w/v) in H₂O for 30s, a wash with distilled water (10 min) and a brief immersion (15 s) in aniline blue (3% w/v) in H₂O. Samples were dehydrated (10 min in 70% ethanol, 10 min in 95% ethanol and 2x10 min in 100% ethanol) and mounted with a mounting medium (Eukitt). The CEF of a clam at SRS 3 was also soaked in acetic acid (10 min, 0.1M) to evaluate the specificity of the stain. Salts of calcium phosphate and calcium carbonate are dissolved with acetic acid. Then all the slices were observed and photographed

with an optical microscope (Leica, DM IRB). The intensity of the staining was visually assessed.

RESULTS

Raman micro-spectrometry results

Raman spectra measured on non-BRD-affected clams

Raman spectra measured on *the inner layer of different valve zones of a non-BRD-affected adult clam* were compared (Fig. 1). In the 155-1460 cm^{-1} wavenumber range, the Raman spectra measured on the surface of the non-BRD-affected adult clam (A1) are similar in all zones of the valve, and the strong bands observed at 155 cm^{-1} , 205 cm^{-1} , 271 cm^{-1} , 704 cm^{-1} , 1087 cm^{-1} and 1460 cm^{-1} are straightforwardly assigned to aragonite phase (Kontoyannis & Vagenas 2000, Carteret *et al.* 2009). In the 1018-4071 cm^{-1} wavenumber range, well-defined bands appear in the posterior and siphonal zones (Table 3). Two particular bands, named R1 (around 1100-1140 cm^{-1}) and R4 (around 1500-1525 cm^{-1}) are attributed to carbon-carbon single and double bond stretching vibrations, respectively. As previously reported by Hedeergard *et al.* (2006), the observation of these bands reveals the presence of polyene pigments (Table 3, Fig. 2).

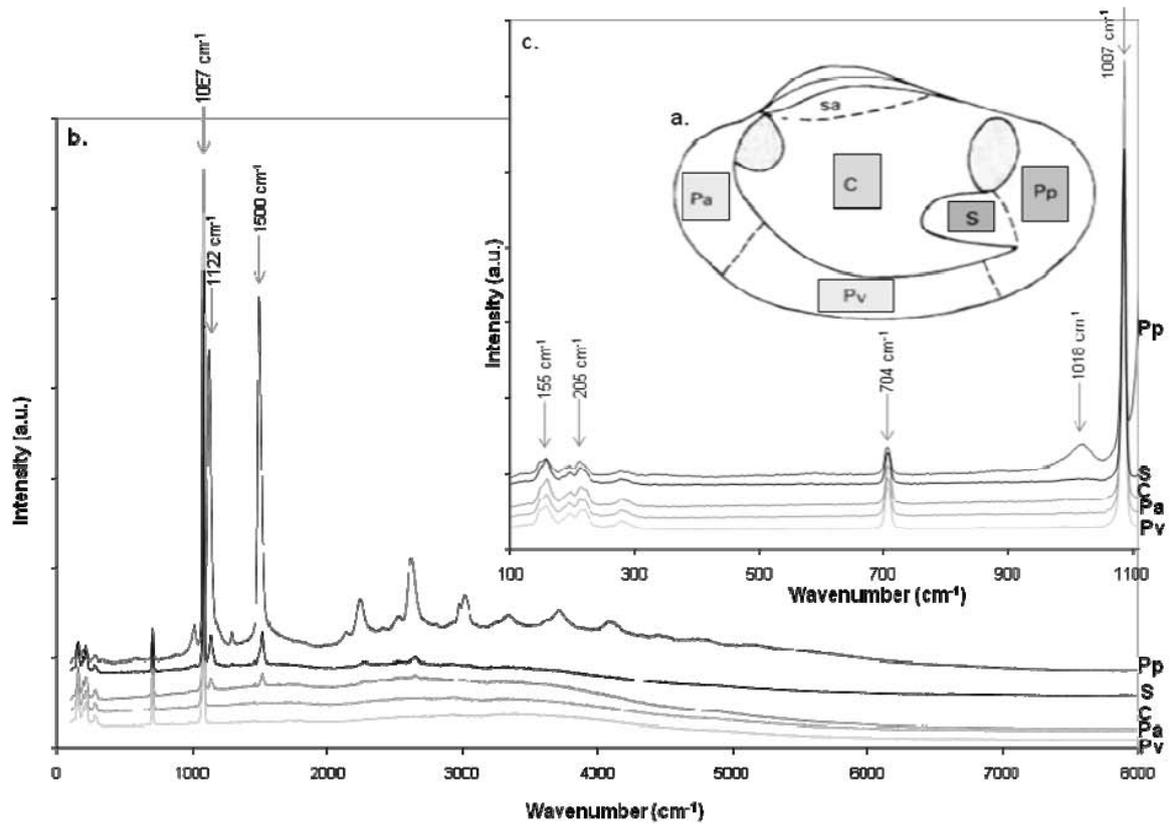


Figure 1: a. Zones of the inner surface of *Ruditapes philippinarum* shell (right valve); b. Raman spectra acquired on surface of a non-BRD-affected adult (A1) shell in different regions: C: Central zone, Pa: Peripheral anterior zone, Pp: Peripheral posterior zone, Pv: Peripheral ventral zone, S: Siphonal zone, SA: Sub Articulation zone; c. Zoom of low wavenumber (cm^{-1}) ($1/\text{wavelength}$). The baselines are vertically shifted to facilitate comparison, a.u.: arbitrary unit (intensity normalized by dividing intensity by acquisition time (s) and the laser power (mW)).

	Inner layer	R1	R4
Fig 1 A1*	H Adult	1122	1500
Fig 3-1 J1	H Juvenile	1135	1527
Fig 3-2 J2	H Juvenile	1136	1530
Fig 4 A2	H Adult	1139	1530
Fig 4 J3	H Juvenile	1121	1501
	H Adult	1136	1529
Fig 5	Adult SRS3	1126	1505
	Adult SRS3	1139	1531
	Adult SRS3	1127	1511
	Adult SRS3	1123	1511
	Adult SRS3	1127	1506
	Outer layer		
Fig 4 A2	Adult	1135	1530
Fig 4 J3	Juvenile	1117	1497

Table 3: Wavenumbers of pigment bands of clam shell (cm^{-1}). R1 designates wavenumbers of carbon-carbon single bond stretching vibration, R4 wavenumbers of carbon-carbon double bond stretching vibration; * other pigment bands of A1: 1018 cm^{-1} , 1122 cm^{-1} , 1166 cm^{-1} , 1291 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} , 2130 cm^{-1} , 2241 cm^{-1} , 2411 cm^{-1} , 2502 cm^{-1} , 2609 cm^{-1} , 2787 cm^{-1} , 2975 cm^{-1} , 3009 cm^{-1} , 3311 cm^{-1} , 3681 cm^{-1} and 4071 cm^{-1} , H: non-BRD-affected, SRS3: total shell repair.

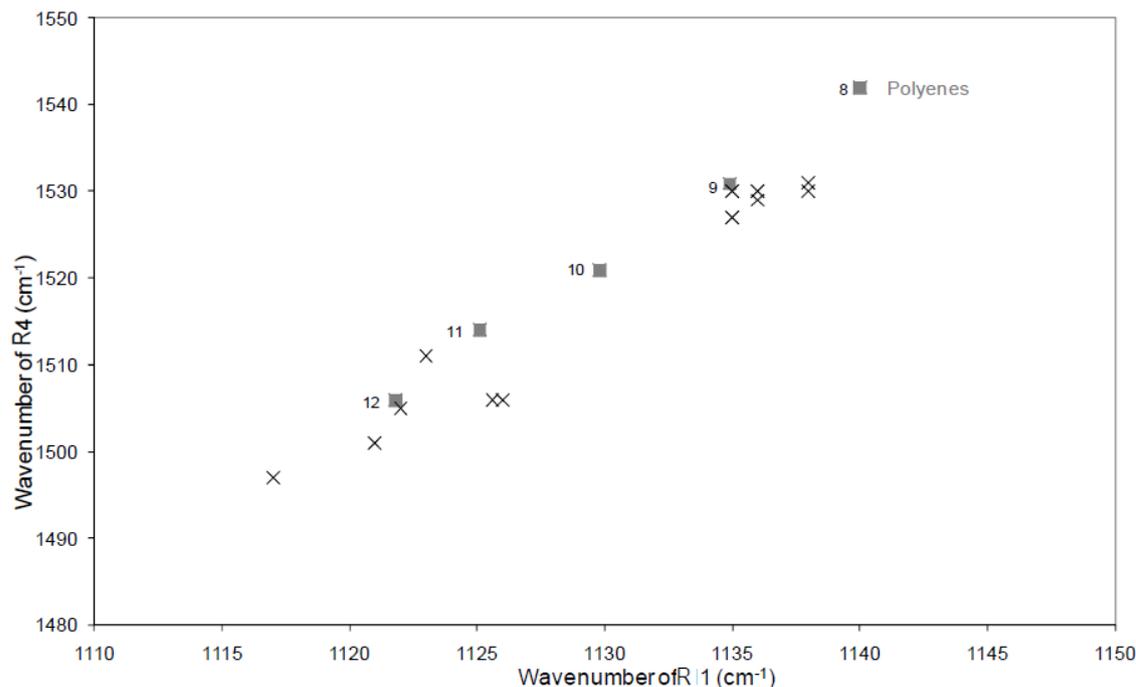


Figure 2 : R1: wavenumbers (cm^{-1}) ($1/\text{wavelength}$) of carbon-carbon single bond stretching vibration, plotted against R4: wavenumbers of carbon-carbon double bond stretching vibration. X: *Ruditapes philippinarum* samples reported in Table 3; ■: predicted Raman shift of resonantly coupled modes for polyenes with different chain length reported by Hedegaard *et al.* (2006).

Figure 3 shows Raman spectra of the inner layers of *non-BRD-affected adult and juvenile clam shells*. Raman spectra acquired on surface of non-BRD-affected juvenile clams (J1 and J2) show the presence of aragonite and polyenes bands and a strong luminescence. In juvenile spectra (J1, J2), the luminescence intensity is systematically higher than in adult one (A1). In juvenile clam shell, sometimes, the serie of polyene bands can also be more difficult to observe because the peaks are of much lower intensity (related to the concentration of pigment), and/or they are masked by the luminescence of the sample.

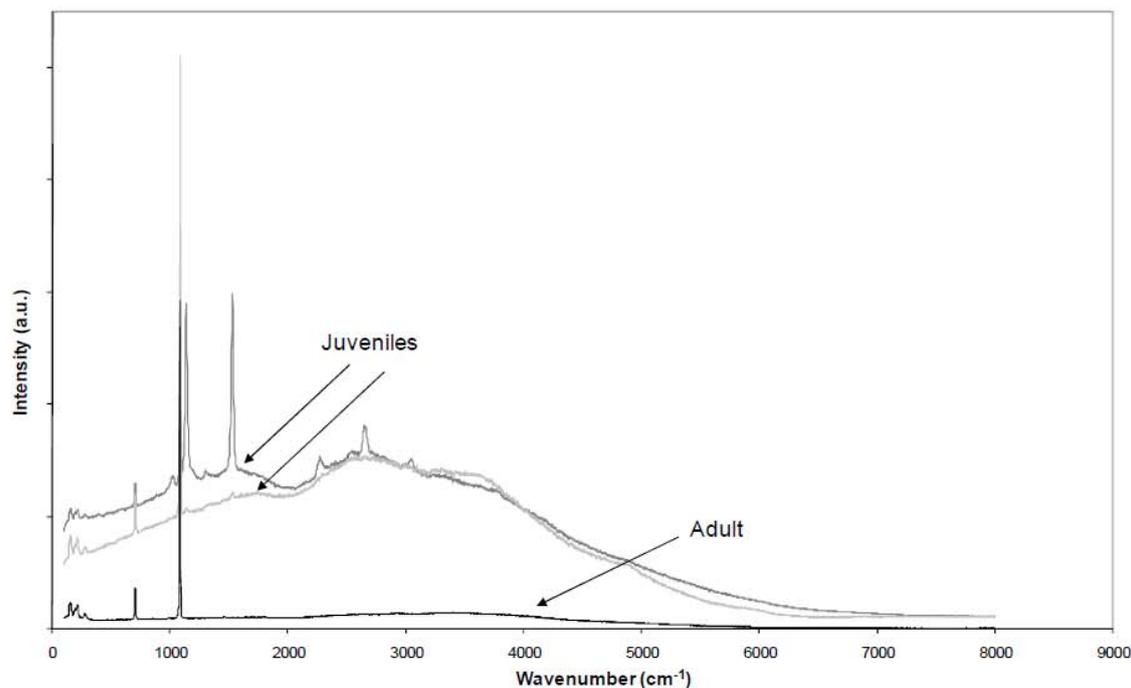


Figure 3: Raman spectra acquired on surface of inner layer of non-BRD-affected shells of *Ruditapes philippinarum*, on one adult A1 (Ventral Zone, dark spectrum) and two juveniles J1 (Ventral Zone, grey spectrum) and J2 (Central Zone, dark-grey spectrum). The baselines are vertically shifted to facilitate comparison, wavenumber (cm^{-1}): $1/\text{wavelength}$, a.u.: arbitrary unit (intensity normalized by dividing intensity by acquisition time (s) and the laser power (mW)). The dome-like curves (juveniles) corresponds to the intrinsic luminescence.

Finally, Raman spectra measured on *the inner and outer layers of non-BRD-affected adult and juvenile clam shells* were compared in Figure 4. Raman spectra acquired on the edge of juvenile (J3) and of an adult (A2), show well-defined vibrational bands attributed to aragonite and polyenes. Furthermore, the adult outer layer exhibits a higher luminescence intensity than its inner layer. The juvenile outer layer presents a lower luminescence intensity than its inner counterpart (Fig. 4). The luminescence intensity observed in the juvenile inner layer is higher than in the adult inner layer. Finally, the luminescence intensities of the juvenile and adult clam outer layers are quite similar (J3 and A2; Fig. 4).

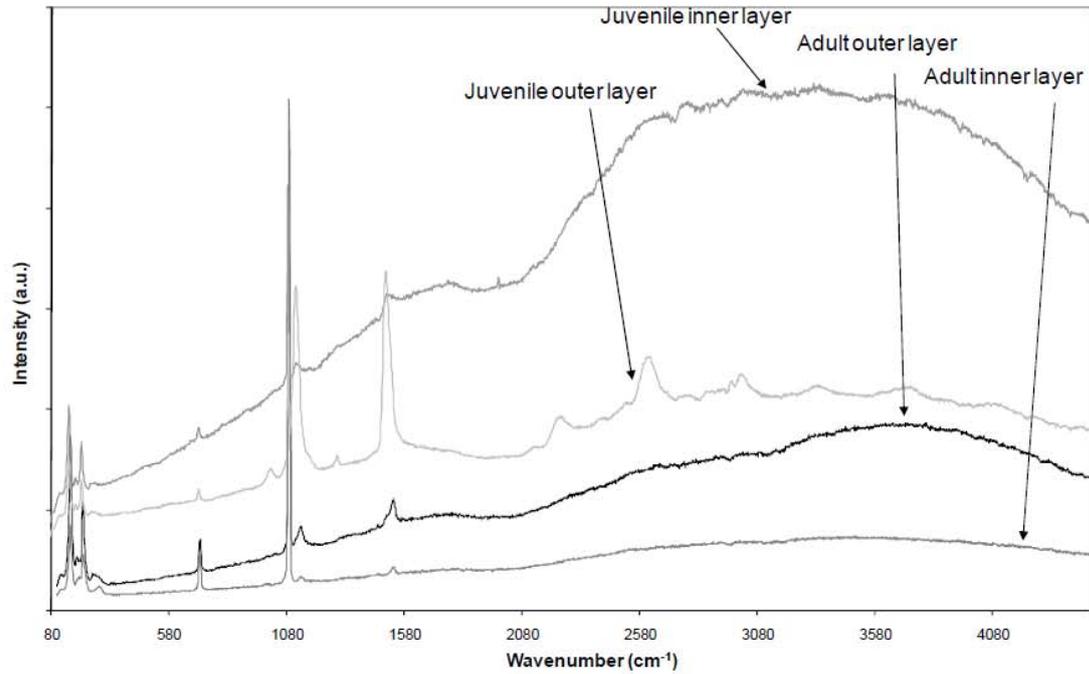


Figure 4: Raman spectra acquired on the edge of non-BRD-affected clam *Ruditapes philippinarum* shells, one adult A2 and one juvenile J3, to measure the signatures of inner and outer layers. The baselines are shifted vertically to facilitate comparison, wavenumber (cm^{-1}): $1/\text{wavelength}$, a.u.: arbitrary unit (intensity normalized by dividing intensity by acquisition time (s) and the laser power (mW)). Note that the juveniles exhibit high luminescence.

Raman investigations on clams affected by the Brown Ring Disease

Figure 5 shows Raman spectra acquired on the brown deposits, at different SRS. At SRS 0, before repair, high-luminescence signal is observed. During the process of shell repair (from SRS 1 to SRS 3), the main aragonite bands (usually observed between 158 cm^{-1} to 1087 cm^{-1}) become more prominent. At the end of the repair process (SRS 3), polyene bands also reappear in the wavenumber range $1037\text{-}4091 \text{ cm}^{-1}$.

Thus, the aragonite bands were always observed in non-BRD-affected adult and juvenile shells as well as in repaired shell, and not in organic brown rings. Similarly, the polyene bands are observed in non-BRD-affected and repaired clams, but never in the brown rings (Fig. 5).

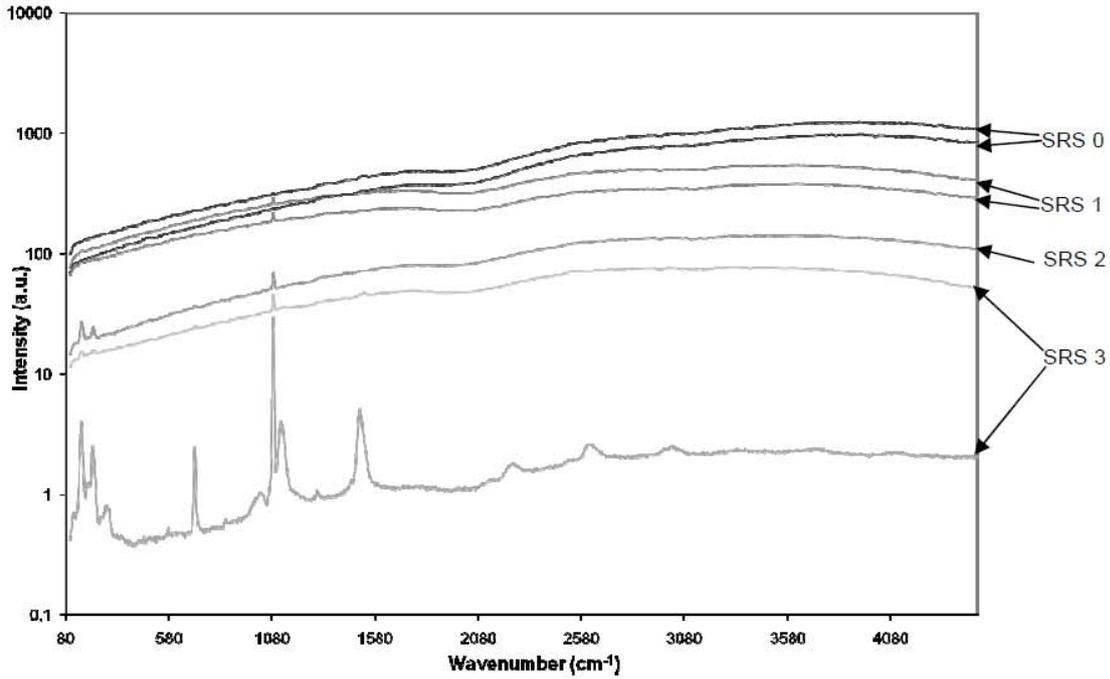


Figure 5: Raman spectra acquired on the surface of 7 samples of *Ruditapes philippinarum*, with different Shell Repair Stages (SRS); SRS 0: disease without repair, SRS 1: calcified points, SRS 2: calcified plates and SRS 3: total shell repair. The baselines are not shifted vertically, wavenumber (cm^{-1}): $1/\text{wavelength}$, a.u.: arbitrary unit (intensity normalized by dividing intensity by acquisition time (s) and the laser power (mW)).

SEM results

Microstructure of non-BRD-affected clams

The internal shell surfaces of non-BRD-affected clams were observed by SEM. The figure 6 a. shows that the inner layer is composed of organized, flattened and imbricate crystals that are embedded in a thin organic layer (Fig. 6, a.). After a surface treatment with sodium hypochlorite, the thin organic layer disappears (Fig. 6, b.). In the case of the outer layer (visible at the edge of the shell), the calcium crystals form mounds like prisms in surface view (Fig. 6, c.).

Microstructure of clams affected by the BRD

At the beginning of the BRD process, the brown deposits appear on the internal shell surface. SEM observations show that they are constituted of a thick organic layer, which is laid down on the inner shell layer (Fig. 6 d.). From SRS 1 to SRS 2.5, SEM results show that calcium carbonate minerals are progressively settled on the brown deposit, until the affected zone is almost entirely covered (Figs. 6 e.-o.). At SRS 1, in non-NaOCl-treated shells, minerals seem partially masked under a thick organic matrix which looks like the BRD organic matrix (Fig. 6 e.). After sodium hypochlorite treatment, we noticed a great variability of microstructures in SRS 1, from rounded 'spherulitic-like' (Fig. 6 f.) to rectangular (Fig. 6 g.). In treated fragments, the rectangular minerals are surrounded by a thin organic matrix, as the sodium hypochlorite treatment degrades this matrix, it forms holes (Fig. 6 g.). During SRS 2, 2.5 and 3, with treatment, spherulitic-like (Fig. 6 h., i., l.) and rectangular microstructures are also observed (Fig. 6 o.). From SRS 1 to SRS 2.5, calcium carbonate minerals are not well organized.

At SRS 2.5, an organic layer appears and partially covers the calcium carbonate crystals mounds (Fig. 6 j., k.). At the end of the shell repair (SRS 3), this organic layer entirely covers crystals (Fig. 6 m.). It is quite thick, bright and smooth (Figs. 6 j., k., m.), and appears different from the organic matrix of the non-BRD-affected inner layer and from the brown deposit (Fig 6 d.). Under the BRD-organic layer, calcium carbonate minerals exhibit an organization similar to that observed from SRS 1 to SRS 2.5, in particular rectangular structures (Fig. 6 g., o.).

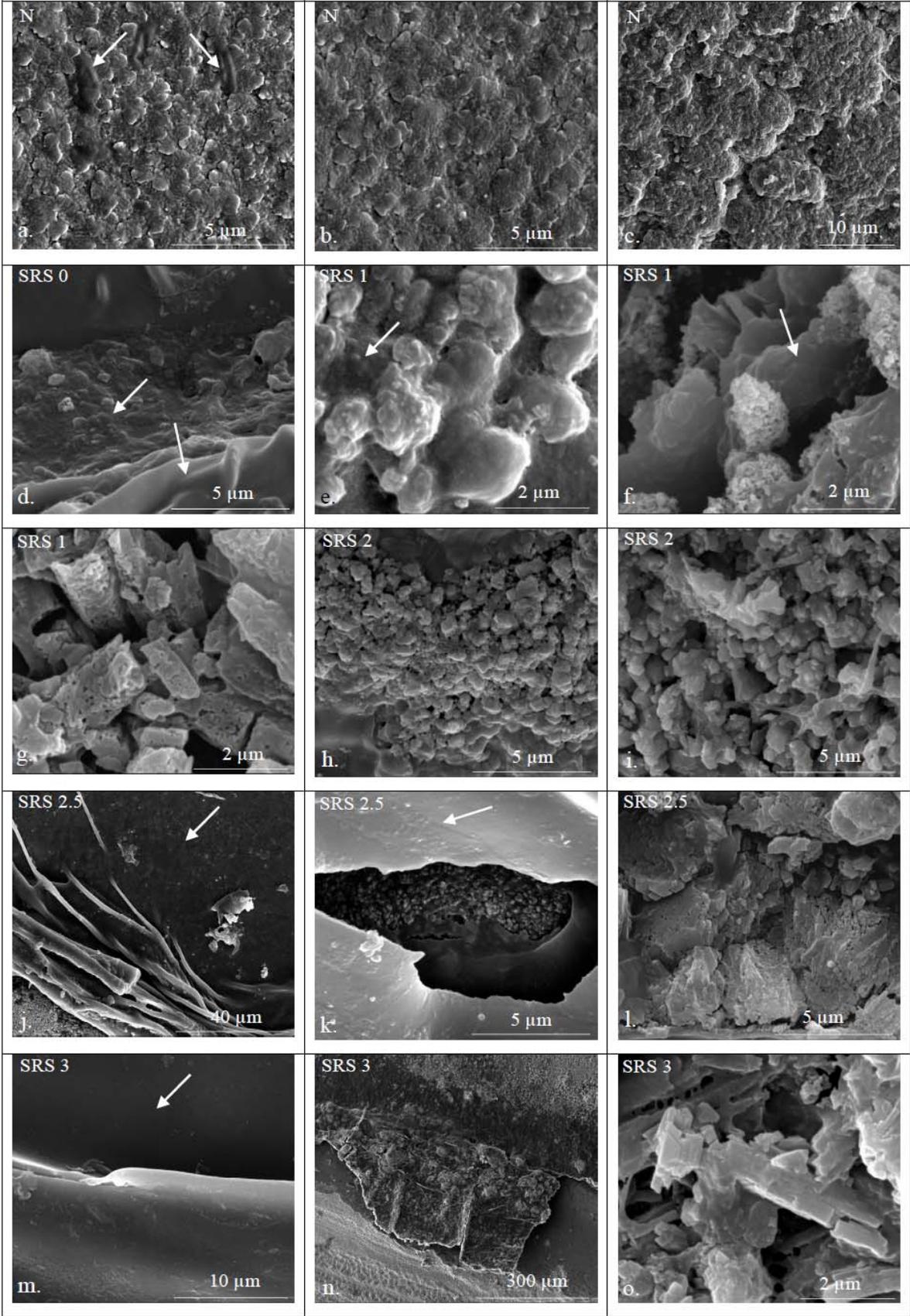


Figure 6: SEM view of inner surface of clam *Ruditapes philippinarum* shells; a, b: non-BRD-affected (N) inner layer, c.: non-BRD-affected outer layer, d.: brown deposit without shell repair: Shell Repair Stage (SRS) 0, e, f, g: SRS 1, h, i: SRS 2, j, k, l: SRS 2.5, m, n, o: SRS 3., On figures b, f, g, i, l, n, o, shells were soaked in sodium hypochlorite solution (0.027 % of active chlorine) for 2h. Organic matrices were located by arrows. Scale of a., b., d., h., i., k., l.: 5 μm , scale of c., m.: 10 μm , scale of e., f., g., o.: 2 μm , scale of j.: 40 μm , scale of n.: 300 μm .

Von Kossa staining

In all clams, some hemocytes on each glass slide were coloured with Von Kossa stain whatever the conditions and the compartments, but their proportion and the intensity of the brown staining varied depending on the nature of the sampled fluid (hemolymph, CEF, PEF) and on the repair stage (Fig. 7, Table 4). The brown intensity of the staining and the proportion of stained hemocytes of each slide were visually assessed. Table 4 summarizes the obtained results. In non-BRD-affected clams, the proportion of stained hemocytes was lower in hemolymph than in both extrapallial fluids, but the intensity of the staining was lower in the CEF than in the hemolymph and in the PEF (Figs. 7 a.-c., Table 4). At SRS 1, the proportion of stained hemocytes increased in hemolymph and the brown intensity increased in CEF (Figs. 7 d.-f., Table 4). At SRS 2, the proportion of stained hemocytes and the brown intensity drastically decreased in hemolymph. At the same time, the proportion of stained hemocytes increased in both extrapallial fluids, similarly to the staining intensity (Figs. 7 g.-i., Table 4). At SRS 2.5, the proportion of stained hemocytes and the brown intensity increased in hemolymph, reaching a higher level than that recorded for non-BRD-affected hemolymph. At the same time, the brown intensity decreased slightly in both extrapallial fluids (Figs. 7 j.-l., Table 4). During this stage, the proportion of stained hemocytes and the brown intensity were high or very high in hemolymph and both extrapallial fluids (Figs. 7 j.-l., Table 4). At the end of the shell repair (SRS 3), the situation was similar to SRS 2.5, with the exception that the proportion of stained hemocytes and the brown intensity decreased slightly in hemolymph, where it was moderate and intermediate, respectively, similarly to the level found in non-BRD-affected hemolymph (Figs. 7 m.- o., Table 4).

At stage SRS 3, soaking a glass slide of CEF rich in brown stains in acetic acid induced the disappearance of the brown Von Kossa stain. (Figs. 7 p.,q.). This strongly

Chapitre 3

suggests that the staining was specific of insoluble calcium salts. The remaining dark dots localized likely aggregates of uric acid or urate (Gabe 1968).

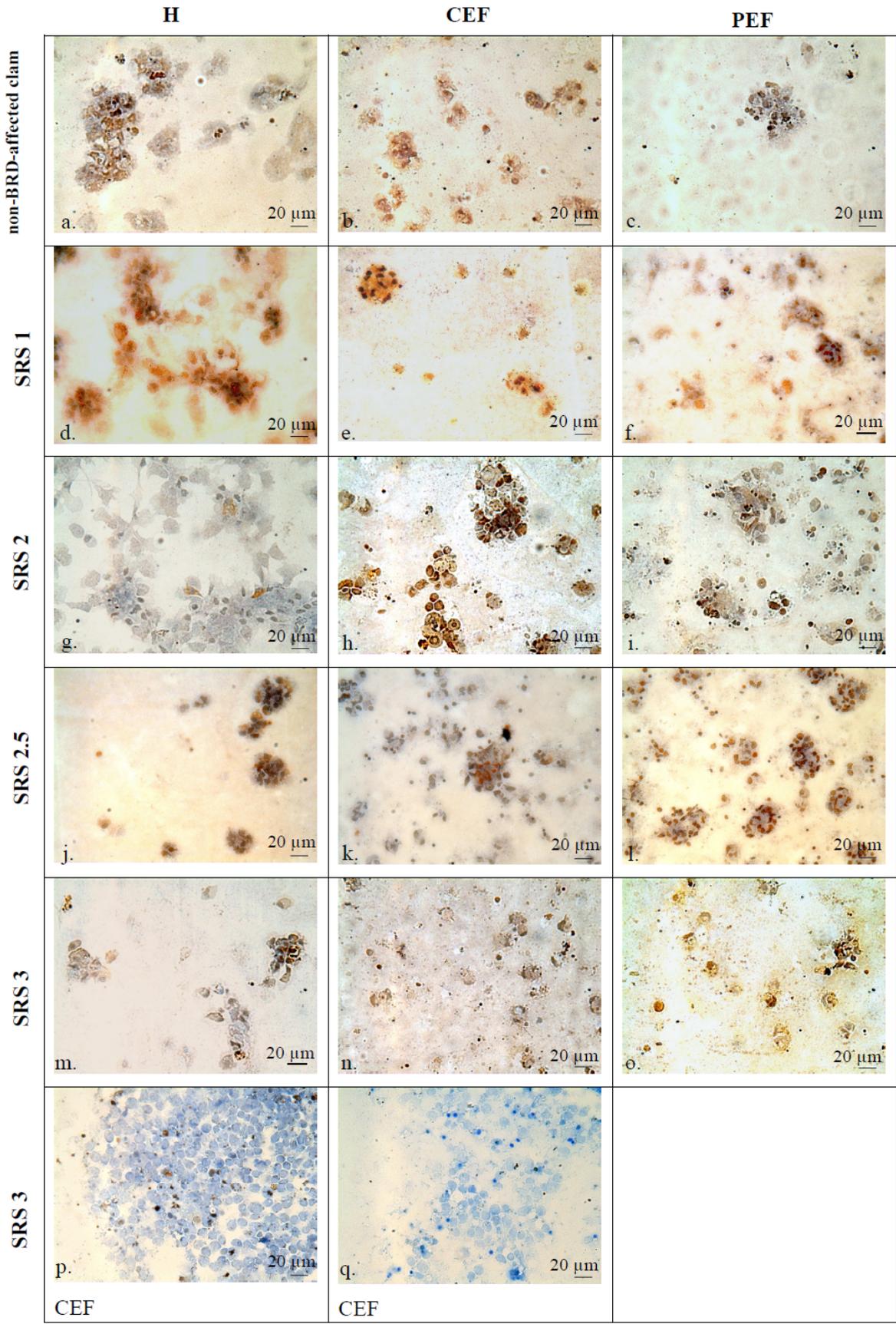


Figure 7: Examples of *Ruditapes philippinarum* hemocytes colored with Von Kossa stain, observed by optical microscopy, x 400; a.-c.: one non-BRD-affected sample, d.-f.: one sample at Shell Repair Stage (SRS) 1, g.-i.: one sample at SRS 2, j.-l.: one sample at SRS 2.5, m.-o.: two samples at SRS 3, p. q.: one sample at SRS 3 with previous soaking in water p. and in acetic acid q.

H: Hemolymph, CEF: Central Extrapallial Fluid, PEF: Peripheral Extrapallial Fluid.

	Hemolymph		CEF		PEF	
	Staining intensity	Proportion of stained hemocytes	Staining intensity	Proportion of stained hemocytes	Staining intensity	Proportion of stained hemocytes
Non-BRD-affected	Intermediate	Moderate	Moderate	Medium	Intermediate	Medium
Repaired specimens						
SRS 1	Intermediate	Medium	Intermediate	Medium	Intermediate	Medium
SRS 2	weak	Low	Very high	Very high	Very high	Very high
SRS 2.5	high	High	High	Very high	High	Very high
SRS 3	Intermediate	Moderate	High	High	High	High

Table 4: Example of individual qualitative evaluation of the brown intensity and the proportion of stained hemocytes of adult clam fluids with different shell repair stages, after a coloration with *Von kossa* stain, H: Hemolymph, CEF: Central Extrapallial Fluid, PEF: Peripheral Extrapallial Fluid.

DISCUSSION

In the present study, we have analyzed the shell repair process of the Manila clam by using three different analytical tools: confocal Raman micro-spectrometry, SEM, and staining of hemocyte for insoluble calcium salts. Raman micro-spectrometry confirmed that non-BRD-affected shells were fully made of aragonite, the metastable polymorph of calcium carbonate (Kontoyannis & Vagenas 2000), which is not, *per se*, surprising: earlier studies evidenced that the two layers constitutive of the Manila clam shell, i.e., the outer composite prismatic and the internal homogeneous one, are aragonitic (Taylor *et al.* 1973). More interesting is the fact that aragonite – and aragonite only - was found also in the repair zone, above the brown ring, which is fully organic and does not contain any mineral. Nor did we detect traces of vaterite

nor of calcite. Earlier publications on molluscan shells repair refer to the fact that in some particular cases, aragonite was sometimes replaced by calcite or by vaterite (Muzii *et al.* 1966, Saleuddin & Wilbur 1969, Saleuddin 1971, Meenakshi *et al.* 1975, Blackwelder & Watabe 1977, Suzuki 1979). Another contribution of Raman micro-spectrometry was the identification of a polyene pigment signature, characterized by sixteen bands from 1018 to 4071 cm^{-1} . Polyenes are found in both layers of non-BRD-affected shells, as well as in the repaired zone, but they are virtually absent from the brown ring deposit, or their presence is masked by the high luminescence of that layer. Polyenes are poly-unsaturated long carbon chains of the alkene type, i.e., that exhibits 8 to 13 sequences of alternating double and single carbon-carbon bands (16 to 26 carbon atoms), with terminal $-\text{CH}_3$ groups (Hedegaard *et al.* 2006). To our knowledge, this is the first evidence that polyenes are present in the shell of the Manila clam. In earlier work, carotenoids were identified in molluscan shells with Raman spectrometry (Zhang *et al.* 2001, Withnall *et al.* 2003, Brink & Van Der Berg 2005), and one recent publication mentions the presence of polyenes in molluscan shells (Hedegaard *et al.* 2006). These polyenes are certainly the pigments responsible for the shell coloration of clams such as purple, brown or yellow of the inner and outer layers. Another contribution of the Raman analysis is the detection of an intense luminescence, particularly in adult and juvenile outer layers, and in juvenile inner layers. This luminescence can be due to several organic compounds: those carrying chromophores or fluorescent groups (Bell *et al.* 2002), organics with amide I groups (Schachar & Solin 1975) or cellulose and lignins (Witke *et al.* 2004). In bivalves, a high luminescence was recorded in the shell nacre nucleus of *Pinctada margarifera* (Rousseau *et al.* 2005). In the outer layer, the luminescence might be caused by the presence of the pigmentation or by the occurrence of organic components, which are specific to the composite prismatic layer. The last point refers to the high intensity of the luminescence in inner layer of juvenile specimens in comparison to adult ones. This may suggest that the ratio organic matrix/calcium carbonate would be higher in juvenile shells than in adult ones.

In 1992 and 1993, the periostracum of non-BRD-affected Manila clams was described. This periostracum resembled the organic layer of the shell repair (Paillard 1992, Paillard & Le Pennec 1993). Furthermore, Paillard *et al.*, 1994 formulated the hypothesis that during a BRD attack, bacteria attach to the periostracum, and causing it to deteriorate. Consequently, it became brown and biomineralization stopped, thereby initiating the beginning of the brown deposit formation (Paillard *et al.* 1994, Paillard & Maes 1995a, b, Trinkler *et al.* 2010). We

could think that after this deterioration, clams need to synthesize a new periostracum and that they can recover just when it is finished.

Another case in point is the microstructure of the repaired *versus* non-BRD-affected layer. As pointed out above, the shell microstructure of the Manila clam is composite prismatic for the outer layer, and homogeneous, for the internal layer. In earlier work, the first one is characterized by bundles of prisms (15-20 micron diameter) which develop parallel to the inner and outer borders of the shell, and which diverge in a fan-like manner. Each individual prism is composed of minute acicular crystals (0.3 μm width) arranged in a feathery manner in radial and tangential sections. The homogeneous layer is made of aggregates of granular crystals (1 to 3 μm) without any preferential direction; from time to time, this layer is divided in sub-layers, where granular crystals are replaced by acicular crystals, which are arranged in 'chevron' patterns, reminiscent of a fine crossed-lamellar microstructure (Shimamoto 1986). In our study, the surface of the internal layer is characterized by organized, flattened and imbricate crystals covered by a thin organic layer, while the outer layer form 'mounds'. This structure is typical of the composite prismatic layer, when observed in transverse view. In the repair zone, the microstructures present a greater variability. The formed crystals of the repair layer exhibit three shapes: rounded spherulitic-like, quadrangular and elongated. Spherulites or/and polygonal units of crystals such as in composite prismatic were already observed in shell repairs such as *Oncomelania formosa* (Davis 1964) *Murex fulvescens* (Muzii *et al.* 1966), *Pomacea paludosa* (Blackwelder & Watabe 1977, Watabe & Blackwelder 1980), *Helix pomatia* (Abolins-Krogis 1963), *Nautilus macrophalus* (Meenakshi *et al.* 1975). The broader variability of the microstructures observed in the repair zone clearly suggests that the cells -mantle tissue or hemocytes - that produces the repair layer do not have a steady functioning during the repair process. Another hypothesis implies that the mantle responsible for the mineral deposition in the repair zone is moving, i.e., that it sometimes withdraws from around the repair zone. A similar phenomenon has been recently observed in the case of the abalone *Haliotis tuberculata* (Fleury *et al.* 2008). A complex functioning of the mantle can also be inferred from the analyses of the organic matrix. In previous publications (Trinkler *et al.* 2009a, Trinkler *et al.* 2010), we showed that the matrix associated with the repair zone was more abundant than the one associated with the homogeneous, non-BRD-affected layer. The 'repair' matrix contains luminescent and sulfated components.

Our study supports a key-role played for hemocytes during the shell repair process. We particularly underline their active contribution to the transport of insoluble calcium carbonate salts to the site of mineralization. Our study corroborates the one of Allam (1998), performed on the same species, in which holes were drilled in Manila clams shells and sealed with pieces of sterile coverslip glass. A few days after inoculation of *V. tapetis* in the tested specimens, hemocytes were detected on the coverslips.

If hemocytes are unquestionably involved in cellular responses following shell alteration, they may on the other hand play multiple functions, depending on the mollusc model and on the characteristics of the shell injury. For example, in the freshwater snail *Pomacea paludosa*, 3 days after shell removal, hemocytes were detected in the extrapallial space (Watabe & Blackwelder 1980). They eventually aggregated with other cell fragments to form a cellular barrier, which contributed to the deposition of a new mineral phase seven days after the shell removal. During this shell repair process, calcium was mostly localized in the intercellular space and hemocytes did not show a higher calcium concentration than epithelial cells. The edible mussel *Mytilus edulis* represents a second example of another role played by hemocytes: after a periostracum damage, hemocytes migrated through the epithelium to take part of the production of the regenerated periostracum (Dunachie 1963). In the freshwater bivalve *Anodonta grandis*, after a shell damage, hemocytes accumulated in the thickness of the altered mantle, where they were presumably responsible for regenerating the injured part of the mantle (Saleuddin 1967). At last, in *Crassostrea virginica* affected by JOD (Juvenile Oyster Disease) – a pathology characterized by a brown deposit of conchiolin on the inner layer of valves like BRD, hemocytes were observed on the conchiolin deposit and in the altered mantle by histology (Bricelj *et al.* 1992, Ford & Borrero 2001). These four examples clearly show that hemocytes, although similarly localized in the sub-epithelial region of the repairing mantle, play different roles, in addition to the transport of the mineral material.

In our study, for technical reasons, we were not able to demonstrate whether the calcium carbonate particles transported by hemocytes were amorphous or crystalline. This question is currently debated. Previous work has evidenced the existence of calcium carbonate granules in calcifying molluscan mantle tissues (Roinel *et al.* 1973), either intracellular (Fournié & Chétail 1982) or extracellular (Istin & Masoni 1973). In most of the cases, although no precise studies were done on their structure, these granules were assumed to be amorphous: having a greater solubility than their crystalline counterparts, amorphous calcium carbonate minerals represent a source of calcium, which is rapidly available and easily

remodeled. However, one recent example diverges from this rule: in the eastern oyster *Crassostrea virginica*, Mount *et al.* (2004) have demonstrated that refractive granulocytes - a subclass of hemocytes - contained calcium carbonate in a crystalline form. A combination of SEM observations and Raman spectrometry measurements showed that these crystals appeared with sharply defined edge and were calcitic. These crystals were directly brought and released at the mineralization site by granulocytes. So far, it is not known whether the *Crassostrea virginica* model is the exception or the rule (Mount *et al.* 2004).

Numerous studies have described that the total hemocyte counts in Manila clam hemolymph increased during the first days of BRD, then decreased, whereas the total hemocyte count in extrapallial fluids always increased. It was explained as a mobilization of hemocytes to the extrapallial fluids (Allam *et al.* 2000a, Allam *et al.* 2000b). Hemocytes were also observed in the degenerated mantle after a BRD attack (Allam *et al.* 2002). However, none of these works studied the link with the shell repair. On the other hand, one previous work studied the correlation between hemocytes and resistance to BRD, but never linked it to the shell repair. In 2001, Allam and coworkers observed that different populations of *R. philippinarum* (From France and from USA) and *R. decussatus* (from France) did not exhibit the same capability to overcome the BRD. Greater resistance was associated with a higher concentration of granular hemocytes and a greater phagocytic activity (Allam *et al.* 2001).

If these observations are confirmed, we can then seriously envisage the selection of BRD-resistant stocks of Manila clams from sampling of their hemocytes. However, additional work on the cell typology of the Manila clam immune system, combined with the identification of molecular markers of hemocytes types using a proteomics approach, appear as an essential prerequisite.

Acknowledgments: We would like to thank Alain Lemerrier and Nelly Le Goïc for technical assistance, Susan Ford for manuscript corrections, SATMAR (France) for production of juvenile clam and their help on clam deployment, Monique Briand for the figures and the ARN multistress for financing.

LITERATURE CITED

- Abolins-Krogis A (1963) The morphological and chemical basis of the initiation of calcification in the regenerating shell of *Helix pomatia* (L.). Acta Universitatis Upsaliensis 20:5-22
- 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*. Université de Bretagne Occidentale
- Allam B, Ashton-Alcox KA, Ford SE (2001) Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes spp.* clams. Developmental and Comparative Immunology 25:365-375
- Allam B, Paillard C (1998) Defense factors in clam extrapallial fluids. Dis. Aquat. Org. 33:123-128
- Allam B, Paillard C, Auffret M (2000a) Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. J. Invertebr. Pathol. 76:63-69
- Allam B, Paillard C, Ford SE (2002) Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. Dis. Aquat. Org. 48:221-231
- 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. Org. 41:105-113
- Bell SEJ, Bourguignon ESO, Grady AO, Villaumie J, Dennis AC (2002) Extracting Raman spectra from highly fluorescent samples with "scissors" (SSRS, Shifted-Subtracted Raman Spectroscopy). Raman Spectroscopy 14:17-20
- Blackwelder PL, Watabe N (1977) Studies on shell regeneration. II. The fine structure of normal and regenerated shell of the freshwater snail *Pomacea paludosa*. Biomineralization 9:1-10
- Boggild OB (1930) The shell structure of the mollusks, Vol 2. Mémoire de l'Académie Royale des sciences et des Lettres de Danemark, 9 ème série, Copenhague
- Bricelj VM, Ford SE, Borrero FJ, Perkins FO, Rivara G, Hillman RE, Elson RA, Chang J (1992) Unexplained mortalities of hatchery-reared, juveniles oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). J. Shellfish. Res. 11:331-347
- Brink DJ, Van Der Berg NG (2005) An investigation of green iridescence on the mollusc *Patella granatina*. J. Phys. D: Appl. Phys. 38:338-343

- Carriker MR (1996) The shell and ligament. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AE (eds) The eastern oyster *Crassostrea virginica*. College park, Maryland
- Carteret C, Dandeu A, Moussaoui S, Muhr H, Humbert B, Plasari E (2009) Polymorphism studied by lattice phonon Raman spectroscopy and statistical mixture analysis method. Application to calcium carbonate polymorphs during batch crystallization. *Cryst. Growth Des.* 9:807-812
- Davis GM (1964) Shell regeneration in *Oncomelania formosana* (Gasteropoda: Hydrobiidae). *Malacologia* 2:145-159
- Dunachie JF (1963) The periostracum of *Mytilus edulis*. *Trans. Roy. Soc. Edinburgh* 65:383-411
- Flassch JP, Barret J, Mazurie J, Maes P, Nicolas JL, Noel T, Paillard C, Le Pennec M (1992) L'élevage de la palourde, programme national de recherche sur la maladie de l'anneau brun Les mollusques marins, Biologie et aquaculture, Conference proceedings. Ifremer, Brest, p 127-140
- Fleury C, Marin F, Marie B, Luquet G, Thomas J, Josse C, Serpentine A, Lebel JM (2008) Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata*: A histological and microstructural study. *Tissue & Cell* 40:207-218
- Ford SE, Borrero FJ (2001) Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 78:141-154
- Fournié J, Chétail M (1982) Accumulation calcique au niveau cellulaire chez les mollusques. Proceedings of the Seventh International Malacological Congress, Colloque Calcium et Structures Squelettiques. *Malacologia* 22:265-284
- Fujikura K, Okoshi K, Naganuma T (2003) Strontium as a marker for estimation of microscopic growth rates in a bivalve. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 257:295-301
- Gabe M (1968) Techniques histologiques, Vol. Masson and Cie, Paris
- Gosling E (2003) Bivalve Molluscs. Biology, Ecology and Culture, Vol. Blackwell Science, Oxford
- Gotliv BA, Addadi L, Weiner S (2003) Mollusk shell acidic proteins: in search of individual functions. *Chem. Bio. Chem.* 4:522-529
- Hedegaard C, Bardeau JF, Chateigner D (2006) Molluscan shell pigments: an *in situ* resonance Raman study. *Journal of Molluscan studies* 72:157-162
- Istin M, Masoni A (1973) Absorption et redistribution du calcium dans le manteau des lamellibranches en relation avec la structure. *Calcif. Tissue Res.* 11:151-162

- Jacobs DK, Soldati AL, Wirth R, Huth J, Wehrmeister U, Hofmeister W (2008) Nanostructure, composition and mechanisms of bivalve shell growth. *Geochimica et Cosmochimica* 72:5401-5415
- Jing G, Yan Z, Li Y, Xie L, Zhang R (2007) Immunolocalization of an acid phosphatase from pearl oyster (*Pinctada fucata*) and its *in vitro* effects on calcium carbonate crystal formation. *Mar. Biotechnol.* 9:650-659
- Kontoyannis CG, Vagenas NV (2000) Calcium carbonate phase analysis using XRD and FT-Raman spectroscopy. *Analyst* 125:251–255
- Lécuyer C, Reynard B, Martineau F (2004) Stable isotope fractionation between mollusc shells and marine waters from Martinique Island. *Chem. Geol.* 213:293– 305
- Meenakshi VR, Blackwelder PL, Hare PE, Wilbur KM, Watabe N (1975) Studies on shell regeneration. I. Matrix and mineral composition of the normal and regenerated shell of *Pomacea paludosa*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 50:347-351
- Mount AS, Wheeler AP, Paradkar RP, Snider D (2004) Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science* 304:297-300
- Muzii EO, Catherine H, Skinner W (1966) Calcite deposition during shell repair by the aragonitic gastropod *Murex fulvescens*. *Science* 151:201-203
- Oubella R, Maes P, Paillard C, Auffret M (1993) Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.* 15:193- 197
- Paillard C (1992) Etiologie et caractérisation de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'élevage, *Ruditapes philippinarum* Doctorat d'université, Université de Bretagne Occidentale
- 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
- 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, 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, Maes P (1990) Etiology of the brown ring disease in *Tapes philippinarum*: pathogenicity of a *Vibrio sp.* *C. R. Acad. Sci. Paris* 310:15-20
- Paillard C, Maes P (1994) Brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. *Dis. Aquat. Org.* 19:137-146

- Paillard C, Maes P (1995a) The brown ring disease in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum* I Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. J. Invertebr. Pathol. 65:91-100
- Paillard C, Maes P (1995b) The brown ring disease in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum* II Microscopic study of the brown ring syndrome. J. Invertebr. Pathol. 65:101-110
- Paillard C, Maes P, Oubella R (1994) Brown ring disease in clams. Annual Review of Fish Diseases 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). C. R. Acad. Sci. Paris 309, Série 3:235-241
- Popov SV (1992) Microstructure of shells of some groups of bivalves, pp. 44 , with 8 plates, Vol
- Querne J (2005) Suivi de trois familles de *Ruditapes philippinarum* et évaluation de leur résistance à la maladie de l'anneau brun, stage de master 1, Université de Bretagne Occidentale, Brest
- Renault T, Chollet B, Cochenec N, Gerard A (2002) Shell disease in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, reared in France. J. Invertebr. Pathol. 79:1-6
- Roinel M, Morel F, Istin M (1973) Etude des granules calcifiés du manteau des lamellibranches à l'aide de la microsonde électronique. Calcif. Tissue Res. 11:163-170
- Rousseau M, Lopez E, Couté A, Mascarel G, Smith DC, Naslain R, Bourrat X (2005) Sheet nacre growth mechanism: a Voronoi model. J. Struct. Biol. 149:149-157
- Saleuddin ASM (1967) The histochemistry of the mantle during the early stage of shell repair. Proc. Malacol. Soc. Lond. 37:371-380
- Saleuddin ASM (1971) Fine structure of normal and regenerated shell of *Helix*. Can. J. Zool. 49:37-41
- Saleuddin ASM, Wilbur KM (1969) Shell regeneration in *Helix pomatia*. Can. J. Zool. 47:51-53
- Schachar RA, Solin SA (1975) The microscopic protein structure of the lens with a theory for cataract formation as determined by Raman spectroscopy of intact bovine lenses. Invest Ophthalmol 14:380-396
- Shimamoto M (1986) Shell microstructure of the Veneridae (Bivalvia) and its phylogenetic implications. Tohoku Univ. Sci. Rep. 2nd ser. 56:1-39

- Simkiss K, Wilbur KM (1989) *Biom mineralization, Cell biology and mineral deposition*, Vol. Academic press, San Diego
- Suzuki S (1979) Mineralization of the regenerated organic membrane-shell in *Mytilus edulis* (Pelecypoda). 85:669-677
- Takeuchi T, Sarashina I, Iijima M, Endo K (2008) *In vitro* regulation of CaCO₃ crystal polymorphism by the highly acidic molluscan shell protein Aspein. FEBS Lett. 582:591-596
- Taylor JD, Kennedy WJ, Hall A (1973) The shell structure and mineralogy of the bivalvia, II Lucinacea- Clavagellacea. Conclusions. Bulletin of the british museum (natural history) Zoology, London 22:253-294
- Trinkler N, Labonne M, Marin F, Jolivet A, Bohn M, Poulain C, Bardeau JF, Paillard C (2010) *Ruditapes philippinarum* shell repair face front to the Brown Ring Disease: a follow-up of the organic matrix using Raman spectroscopy and WDS microprobe Anal. Bioanal. Chem. 396:555-567
- Trinkler N, Marin F, Guichard N, Labonne M, Bardeau JF, Paillard C (2009a) Shell repair in the clam *Ruditapes philippinarum*, affected by the Brown Ring Disease (BRD): a biochemical and serological study. Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 1187:89-94
- Trinkler N, Siquin G, Querne J, Paillard C (2009b) 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. In Press
- Urmos J, Sharma SK, Mackenzie FT (1991) Characterization of some biogenic carbonates with Raman spectroscopy. Am. Mineral. 76:641-646
- Watabe N, Blackwelder PL (1980) Ultrastructure and calcium localization in the mantle epithelium of the freshwater gasteropod *Pomacia paludosa* during shell regeneration. In: Omori M, Watabe N (eds) The mechanisms of biomineralisation in animals and plants. Tokai University Press, Tokyo, p 131-144
- Weiss IM, Tuross N, Addadi L, Weiner S (2002) Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. J. Exp. Zool. 293:478-491
- Withnall R, Chowdhry BZ, Silver J, Edwards HG, de Oliveira LFC (2003) Raman spectra of carotenoids in natural products. Spectrochimica Acta Part A 59:2207-2212
- Witke K, Gotze J, Rossler R, Dietrich D, Marx G (2004) Raman and cathodoluminescence spectroscopic investigations on Permian fossil wood from Chemnitz--a contribution to the study of the permineralisation process. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 60:2903-2912

Chapitre 3

Yan Z, Jing G, Gong N, Li C, Zhou Y, Xie L, Zhang R (2007) N40, a novel nonacidic matrix protein from pearl oyster nacre, facilitates nucleation of aragonite *in vitro*. *Biomacromolecules* 8:3597-3601

Zhang G, Xie X, Wang Y (2001) Raman spectra of nacre from shells of main pearl-culturing mollusk in China. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi* 21:193-196

Chapitre 4. La réparation coquillière de la palourde face à la Maladie de l'Anneau Brun : une étude de la matrice organique en utilisant la micro-spectrométrie Raman confocale et la microsonde WDS

Article 3 : Clam shell repair from the Brown Ring Disease: a study of the organic matrix using Confocal Raman micro-spectrometry and WDS microprobe

Les chapitres précédents ont montré que la couche de réparation coquillière a une microstructure différente de celle d'une couche interne saine et que cette différence n'est pas due à un changement dans la nature du polymorphe de carbonate de calcium (aragonite) (article 2). Par ailleurs, une couche organique épaisse est observée à la fin de la réparation coquillière (articles 1 et 2).

Le but de ce quatrième chapitre est d'étudier la matrice organique des coquilles de palourdes japonaises dans la couche interne avant, pendant, et après l'apparition du dépôt brun soit durant le processus de réparation coquillière. Pour ce faire, deux techniques expérimentales ont été utilisées : la micro-spectrométrie Raman confocale et la microsonde WDS (« Wavelength Dispersive Spectrometry »). De plus, les matrices organiques de la couche interne saine et de la couche coquillière de réparation ont été extraites et quantifiées à l'aide de protocoles biochimiques standards d'extraction de matrices coquillières.

Le dépôt brun montre une luminescence intense sur les spectres Raman et une augmentation des concentrations en S, C, Sr (formant 2 pics) et une diminution des concentrations en Ca, Na (% w/w) sur les cartographies et les transects obtenus à la microsonde WDS. La signature de ces éléments traces est similaire à celle enregistrée dans la lame périostracale (% w/w). La forte concentration en S correspond sans doute à la présence d'une quantité importante de composés organiques sulfatés.

De plus, les transects Raman montrent la présence de la luminescence dans la fine couche de coquille juste avant l'apparition du dépôt brun. Ceci suggère que cette couche coquillière pourrait être modifiée par les bactéries.

Chapitre 4

Après le dépôt brun, soit au niveau du début du processus de réparation coquillière, la luminescence et la concentration en S restent à un niveau assez haut, avant de décroître jusqu'à atteindre un niveau similaire à celui retrouvé dans les coquilles non symptomatiques. Par ailleurs, la quantification des matrices organiques coquillières montre que la couche de réparation a une composition significativement différente de celle de la couche interne saine. Elle présente particulièrement une quantité plus forte de matrice organique insoluble.

Ce travail descriptif est la première étape de la caractérisation très fine des matrices organiques. Cette caractérisation a été approfondie aux niveaux biochimiques et protéiques et va être présentée dans le chapitre 5.

Cette étude a été soumise dans le journal *Analytical and Bioanalytical Chemistry* et a été publiée. La référence de cet article est *Anal. Bioanal. Chem.* (2010) 396 : 555-567.

Clam shell repair from the brown ring disease: a study of the organic matrix using Confocal Raman micro-spectrometry and WDS microprobe

Nowenn Trinkler · Maylis Labonne · Frédéric Marin ·
Auréli Jolivet · Marcel Bohn · Céline Poulain ·
Jean-François Bardeau · Christine Paillard

Received: 19 June 2009 / Revised: 27 August 2009 / Accepted: 27 August 2009 / Published online: 17 October 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Since 1987, the Manila clam *Ruditapes philippinarum* has been regularly affected by the brown ring disease (BRD), an epizootic caused by the bacterium *Vibrio tapetis*. This disease is characterized by the development of a brown deposit on the inner face of valves. While most of the clams die from the BRD infection, some of them are able to recover by mineralizing a new repair shell layer, which covers the brown deposit by a process of encapsulation. The purpose of this work was to study the organic matrix of the shells of Manila clams in the inner shell layer before, during and after the brown deposit and during the

shell repair process by confocal Raman micro-spectrometry and wavelength dispersive spectrometry (WDS) microprobe. In addition, the organic matrix of the repaired shell layer was extracted and quantified, by using standard biochemical shell matrix extractions protocols. The brown deposit exhibited high luminescence intensity in Raman spectra, and an increase of S, C, Sr (forming two peaks) and a decrease of Ca, Na concentrations (% w/w), using WDS microprobe mapping and cross-sectional transects. The signature of these trace elements was similar to that recorded on periostracal lamina (% w/w). The high S concentration likely corresponds to the presence of a high amount of sulfated organic compounds. Interestingly, on cross-sectional transects, before the brown deposit, a thin layer of the shell showed also a high luminescence, which may suggest that this layer is modified by bacteria. After the brown deposit, at the beginning of the shell repair process, the luminescence and the S concentration remain high, before declining the level found in non-BRD-affected shells. Quantification of the organic matrix shows that the shell repair layer zone is significantly different from non-BRD-affected shell layer, in particular with a much higher amount of insoluble matrix.

N. Trinkler · C. Poulain · C. Paillard (✉)
IUEM, LEMAR, UMR CNRS/UBO/IRD 6539,
Technopole Brest Iroise,
29280 Plouzané, France
e-mail: christine.paillard@univ-brest.fr

M. Labonne
IRD, LEMAR, UMR CNRS/UBO/IRD 6539,
Centre IRD Bretagne,
BP 70, 29280 Plouzané, France

F. Marin
UMR CNRS 5561 Biogéosciences, Université de Bourgogne,
6 Boulevard Gabriel,
21000 Dijon, France

A. Jolivet
Ifremer, STH, Z.I. Pointe du diable,
BP 70, 29280 Plouzané, France

M. Bohn
UMR CNRS 6538, Ifremer, Laboratoire Microsonde,
BP 70, 29280 Plouzané cedex, France

J.-F. Bardeau
LPEC, UMR CNRS 6087, Université du Maine,
72085 Le Mans cedex 9, France

Keywords *Ruditapes philippinarum* · Brown ring disease · Organic matrix · Raman micro-spectrometry · WDS microprobe · Shell repair

Introduction

Mollusks, like numerous invertebrates, build an exoskeleton—the shell—to protect them from external threats and desiccation. Although the shell is mainly composed of calcium

carbonate, it also contains a minor organic matrix (less than 5% w/w), which plays an important role in calcification [1–12]. This organic matrix forms a 3D architecture in which calcium carbonate crystals are nucleated. The site where the mineralization occurs—at the interface between the calcifying mantle epithelium and the shell itself—is protected from the open environment. By constant mucus secretion and by peristaltic movements of their mantle, mollusks have set up an efficient strategy for continuously cleaning this zone, and removing foreign bodies whatever they are: sand grains or micro-organisms (Fig. 1). Sometimes, when particles cannot be removed from the mineralization front, they are coated by a new mineralized layer. This phenomenon called nacreization in nacre mollusks [13] is comparable to a shell repair process. It has been described in a number of cases: “mabé” (nacre jewel made from a hemispheric implant inserted between the mantle and the shell) in the pearl oyster [14] and encapsulation of trematodes such as *Gymnophallus margariferum* and polychaetes such as *Polydora* spp.

A peculiar shell repair process occurs in the manila clams *Ruditapes philippinarum* [15]. This bivalve, originated from the Indo-Pacific ocean, was introduced in Europe for aquaculture purposes between 1972 and 1985 [16, 17]. It is one of the main aquaculture species in the world. This organism is subject to recurrent infections caused by a bacterium named *Vibrio tapetis* [18, 19]. The bacterial infection is characterized by the formation of a brown ring—from which originates the terminology brown ring disease (BRD)—in the inner side of the valves where the mineralization takes place (Fig. 2). Since 1987, the BRD decimated the culture of clams in Brittany, France, and even today, the clam shellfish farming has not recovered yet. The BRD epizootic is not localized to

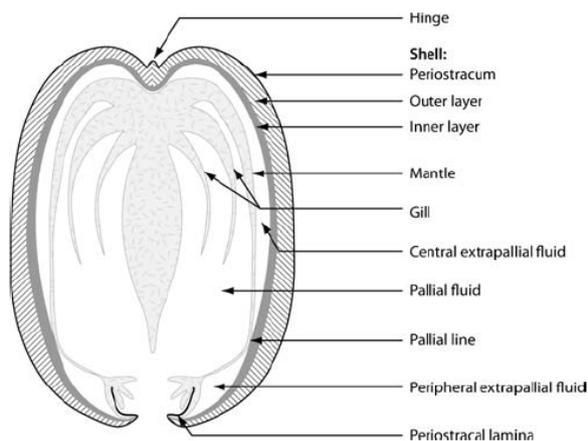


Fig. 1 Cross-sectional diagram showing the relationship of the manila clam shell to the soft tissue such as the mantle and the periostracal lamina



Fig. 2 Photo of the inner surface of a brown ring disease affected clam shell

Brittany: other production spots are touched: along the French Atlantic coast, in England, Ireland, Spain, and Italy, due to clam transfers [20].

The physiological aspects of BRD infection have been described in former studies [21, 22]. In brief, *V. tapetis* colonizes the periostracal lamina, which is composed of two major layers, the periostracum and the fibrous matrix contributing to the outer shell layer (Fig. 1). This phenomenon inhibits the normal process of shell biomineralization. It subsequently induces an accumulation of a brown organic matrix on the inner face of the shell. At this stage, clams often die due to a systemic infection as the bacteria invade their circulatory system. Some resistant specimen can overcome the infection, by secreting a new mineralized layer, which covers the brown matrix [15, 21, 22]. This particular shell repair phenomenon is not yet well understood. Recently, this phenomenon was described by Trinkler et al. [23] using scanning electron microscopy (SEM). They showed that during the repair process, calcium crystals are progressively assembled until the affected zone is entirely covered. At the end of the shell repair process, a final organic layer covers the calcium crystals assemblage.

The aim of this work is to study and quantify the organic matrix in the brown deposit and in the repair shell layer, by using different analytical tools: Confocal Raman microspectrometry, WDS (wavelength dispersive spectrometry) microprobe analysis and organic matrix extractions and quantifications. More precisely, our study constitutes a follow-up of the organic matrix in the shells of manila clams in the inner layer before, during and after the brown deposit and during the shell repair process. Raman microspectrometry provides a qualitative and quantitative analysis of numerous organic and mineral compounds. This tool is often used to characterize biominerals [24–36] but less frequently, to study the associated organic matrix [27, 34–37], in particular the presence of pigments such as

carotenoids [34, 36, 37] and polyenes [27]. Furthermore, WDS microprobe is currently used in mapping or cross-sectional transect analysis, for localizing trace elements in rock minerals and quantifying their concentration. Trace elements, like strontium (Sr) [38–40], are tracers of environmental conditions or, in the case of sulfur (S), tracers of organic matrix [1–6, 41]. WDS microprobe has been used on mollusk shells for X-ray cross-sectional transects [8, 25, 38, 42–46] and occasionally X-ray mapping [42, 43]. It has been used also for mapping the concentrations of calcium and Sr in otoliths, the calcareous concretions found in fish inner ears [47–55]. In the present study, we have adapted the otolith methodology to characterize the recovery of manila clams after BRD infection using ionic cross-sectional transects and mapping of carbon (C), Ca, Sr, S, or sodium (Na) concentrations on shell sections.

Finally, we have also quantified the amount of organic materials in the repair shell zones and in non-BRD-affected specimens, by using standard biochemical shell matrix extractions protocols.

Materials and methods

Clams sampling

Adult manila clams were collected in Landeda (Brittany, France), a site known for its high BRD prevalence [15]. Shells were opened and the soft tissues removed using a scalpel. Then, four shell repair stages (SRS) were determined using a standard binocular microscope. Stage 0 corresponds to a brown deposit without repair. Stage 1 corresponds to the apposition of calcified points. The partial covering of the deposit by wide calcified plates corresponds to Stage 2. In Stage 3, the brown deposit is completely covered by a shell layer [15].

RAMAN micro-spectrometry

Raman experiments were performed on a T64000 Raman spectrometer (Jobin-Yvon, Horiba) equipped with a confocal system and with a monitored microscope stage. A 514.5 nm wavelength radiation from a coherent spectrum argon/krypton ion laser was selected to provide a good signal/noise ratio, but the wavelengths 498 and 647 nm were also tested. The laser was focused onto the sample using a microscope equipped with a $\times 100$ objective. The resulting spatial resolution was around 1–2 μm . The scattered light was analyzed using a spectrometer with a single monochromator (600 gratings mm^{-1}), coupled to a nitrogen-cooled CCD detector. For each sample, parameters were adjusted such as laser power (varying from 30 to 40 mW), spectra accumulation (from 2 to 30 times) and exposure time (from 1 to 50 s) (Table 1). The measurements were systematically performed at 2 μm below the surface to avoid possible surface contaminations.

Raman spectra were normalized by dividing intensity by the acquisition time and the laser power (mW). The peak positions, relative integrated intensities of identifiable vibrational bonds and luminescence on spectra were determined using the LABSPEC software. The position and intensity of bonds in a Raman spectrum relate to the composition and structure of molecules. Since the aim of our work is to investigate the organic matrix, we do not consider vibrational peaks of calcium carbonate (from 155 cm^{-1} to 1460 cm^{-1}).

Raman investigations

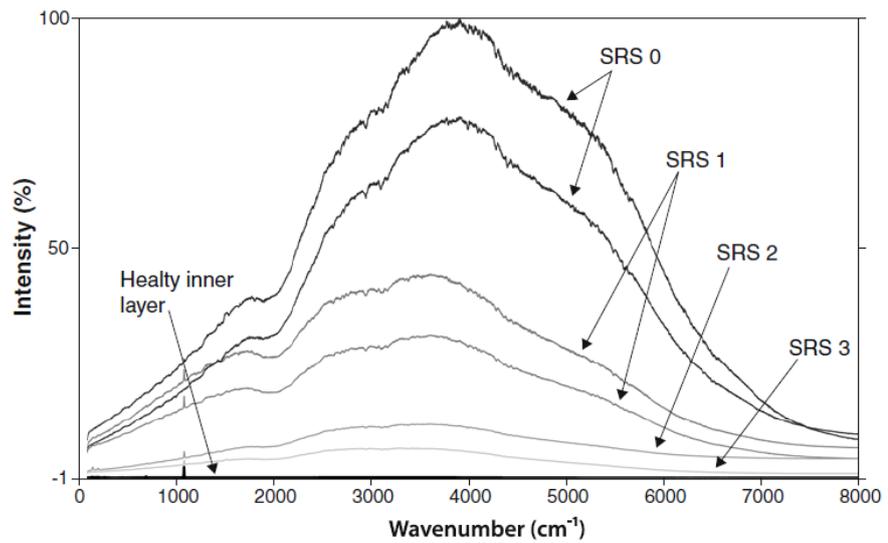
Three different types of analyses were carried out on the samples: (1) surface analyses, (2) cross-sectional transect analyses and (3) various organic matrix analyses.

Punctual Raman measurements were made at 2 μm below the surface of BRD-diseased shells and at different

Table 1 Samples and parameters used for Raman analysis

Samples	Analysis	Parameters		
		Acquisition time	Laser power	accumulation times
2 clams SR0	Surface analysis	1	30	10
2 clams SR1		1	30	10–30
1 clam SR2		2	30	30
1 clam SR3		4	30	30
C1	Cross-sectional transect analysis	5–50	30–40	2 10
C2		40	30	4
C3		2	30	10
C4		2	30	10
C5		2	30	10

Fig. 3 Raman spectra at 514.5 nm acquired on surface of samples, with different SRS; *SRS 0* brown deposit without repair ($N=2$), *SRS 1* calcified points ($N=2$), *SRS 2* calcified plates ($N=1$), *SRS 3* total shell repair ($N=1$), and on the inner layer of a non-BRD-affected clam ($N=1$)



shell repair stages (two clams at SRS 0; 2 at SRS 1; 1 at SRS 2 and 1 at SRS 3; Fig. 3, Table 1).

RAMAN spectra were collected on cross-sectional transects on sections of five clam shells at SRS 3 (C1-C5). Three of them (C1, C2, and C3) were diseased one time and two of them (C4 and C5) twice. For these shells,

interesting zones were sampled using cutting pliers to avoid molecule transformation under heat such as aragonite (the polymorph of CaCO_3 which constitutes the clam shell)/calcite thermal [56]. These analyses were made on the edge, from the inner layer to the repair layer on surface and passing through the brown deposit. Results were similar for

Fig. 4 a View of a cross section of a totally repaired clam shell showing a single BRD deposit C1 (SRS 3) using a binocular microscope $\times 4$, arrow brown deposit, small circles measured point using confocal Raman micro-spectrometry; b Raman spectra at 514.5 nm acquired along a cross-sectional transect, from the inner layer, passing through the brown deposit, to the repair layer on the surface; *O* outer, *I* inner

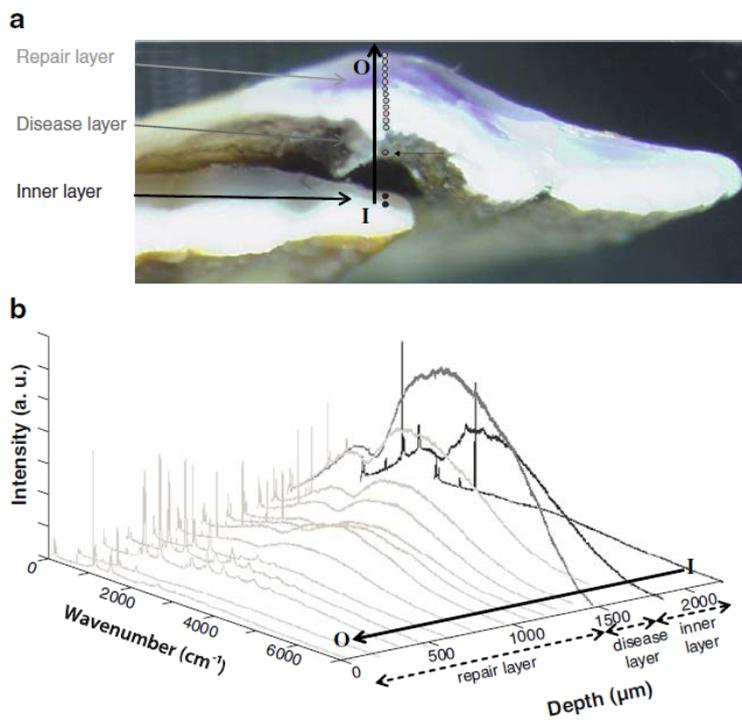
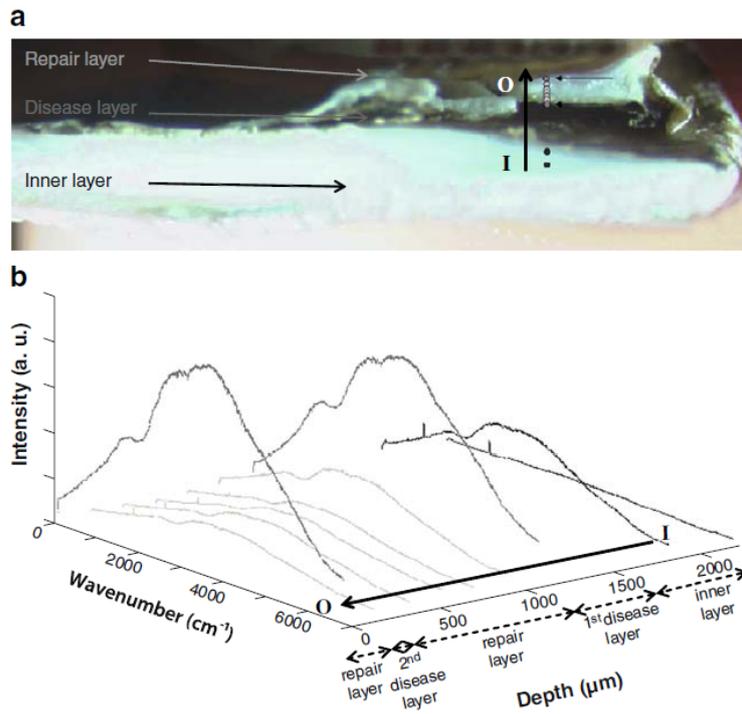


Fig. 5 **a** View of a cross section of a totally repaired clam C4 that has been affected by BRD twice in succession (SRS 3) using a binocular microscope $\times 4$, *arrow* brown deposit, *small circles* measured point using confocal Raman micro-spectrometry; **b** Raman spectra at 514.5 nm acquired along a cross-sectional transect, from the inner layer, passing through the brown deposit, to the repair layer on the surface; *O* outer, *I* inner. This clam shows two BRD (brown ring disease) phenomena



C1–C3 and for C4–C5. We consequently chose to present all C1 and C4 spectra (respectively, clam 1, Fig. 4 and clam 4, Fig. 5) and the evolution of C1–C3 luminescence on the same graph, because these clams had finished their shell repair (Fig. 6). Luminescence intensity was measured on spectra at wavenumbers of 500, 2,900, and 5,000 cm^{-1} where there were not vibrational bonds. Percentages of intensity were calculated by fixing the brown deposit intensity at 100%. These percentages were averaged and standard deviations were measured (Fig. 6).

For determining the origin of the brown deposit and of the repair layer, spectra of *V. tapetis*, strain CECT4600, of mucus and of periostracal lamina were also collected. The *V. tapetis* strain isolated from *R. philippinarum* in Landeda [19] was grown in marine agar (1 L distilled water, 15 g pastagar [AES], 30 g sea salts [Sigma], 4 g peptone [AES], 1 g yeast extract [AES] and 0.1 $\text{Fe}(\text{PO}_4)_2$ [Merck]) at 18 °C. Then, three colonies were placed on a glass slide before measurements. The mucus of non-BRD-affected clams was sampled by injecting a suspension of calcium carbonate

Fig. 6 Variation of luminescence at 514.5 nm with depth on three total repair clams C1, C2, and C3 diseased one time (mean of % intensity at 500 cm^{-1} , 2,900 cm^{-1} , and 5000 cm^{-1})

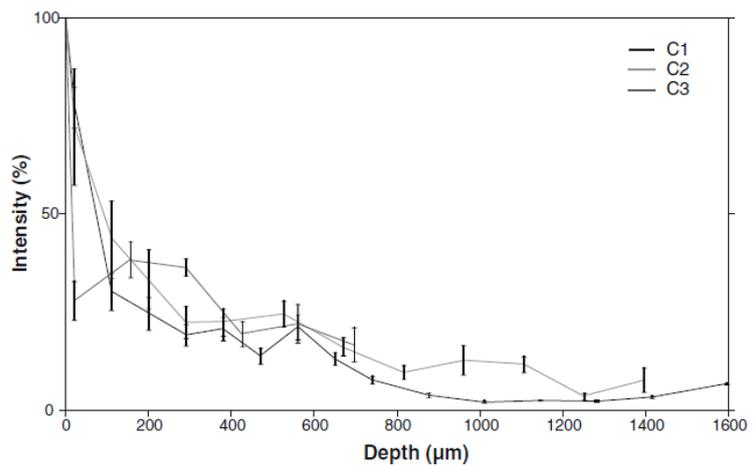
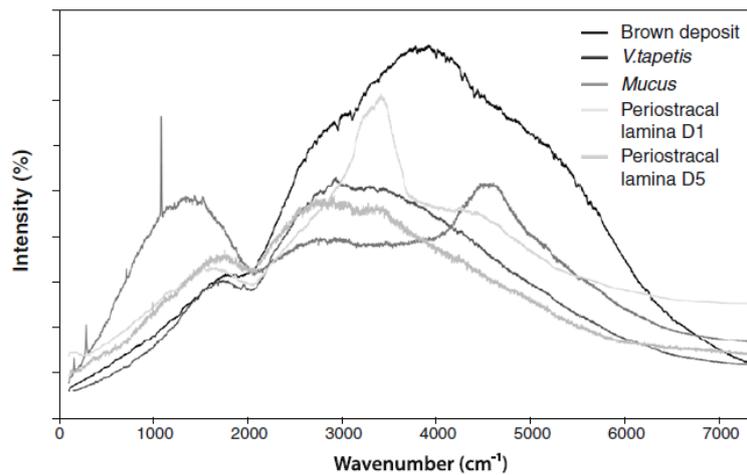


Fig. 7 Raman spectra of different samples which are: the brown deposit of a diseased clam without repair (SRS 0), the mucus of a non-BRD-affected clam, periostracum of a non-BRD-affected clam, just after sampling (D1) and after 5 days in the fridge (D5) and the bacterium which causes the brown ring disease: the *V. tapetis*



powder in the inhalant siphon of three clams. The mucus, together with a white calcium carbonate paste, was ejected by the exhalant siphon. It was collected with a pipette, as previously described [57]. The periostracal lamina of three non-BRD affected clams, was sampled using dissection pliers and a binocular microscope. Analyses were either immediately made (fresh periostracal lamina), or 5 days after storage at 4 °C (old periostracal lamina). These results were then compared with brown deposit ones (Fig. 7).

WDS microprobe

Sample preparation

Five clams at SRS 3 were selected for microchemistry analyses (C6–C10). These shells were cleaned with deionized water, then ethanol (70%), and cut with a diamond saw (Dremel). To obtain the shell sections; the standard preparation consisted of (1) embedding in Araldite epoxy resin, (2) sectioning in transverse plane with a Accutom-50 (Struers) saw to obtained a 700 µm thick section, (3) embedding in Araldite resin on a glass side, (4) grinding with silicone

carbide, and polishing with progressively finer grades of diamonds suspensions using a TegraPol 35 (Struers) to obtained a 1,900 µm final thick section. All preparations were ultrasonically cleaned with Milli-Q water at the end of each polishing stage. They were stored and carbon coated under vacuum just before analysis. The usual precautions were taken to avoid chemical contamination of the shells and to obtain perfect surface conditions as required in microprobe analyses.

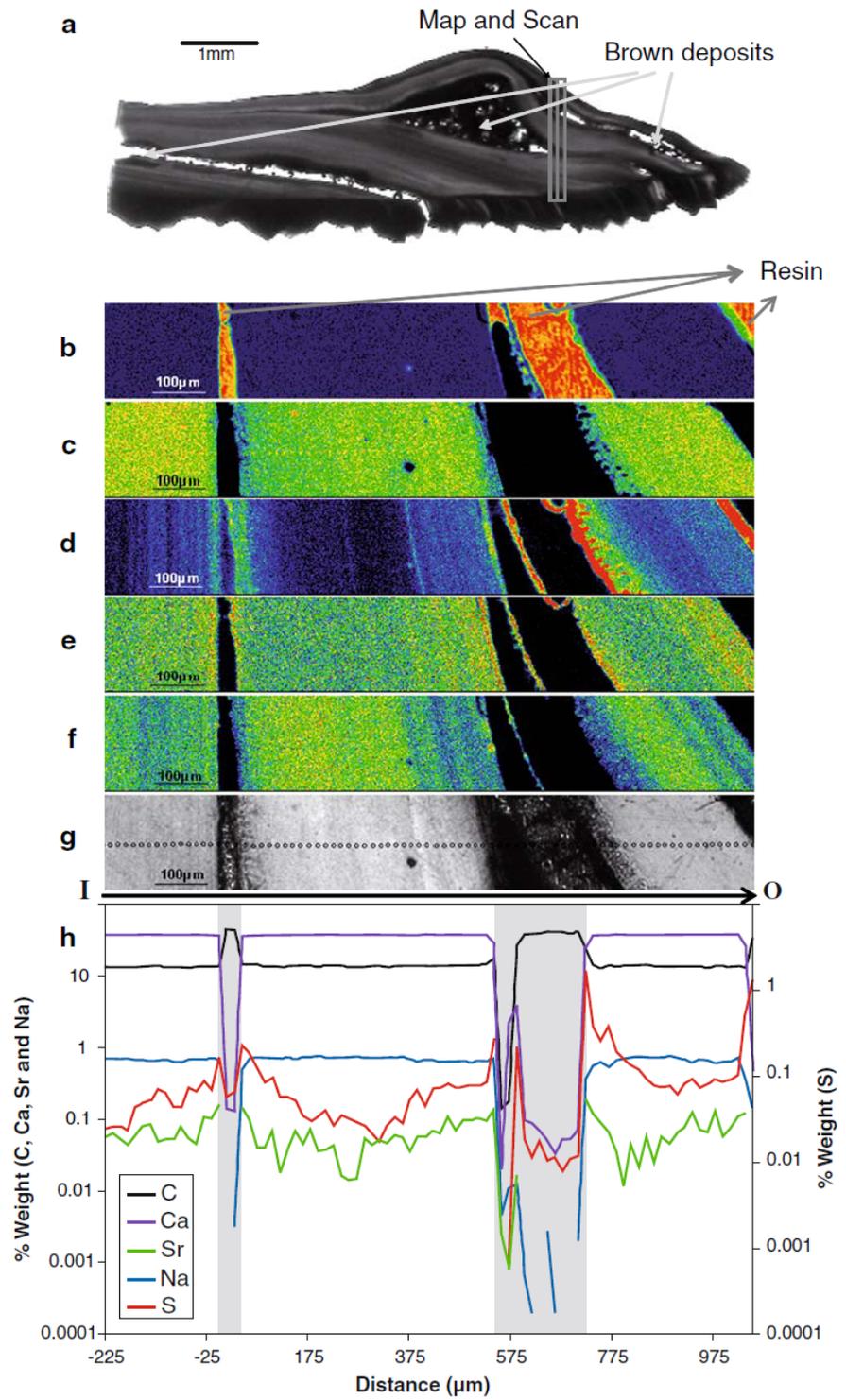
Microprobe analysis

Microprobe analyses were carried out on a Camebax SX 100 WDS microprobe (Cameca) fitted with five spectrometers used to measure calcium (Ca), carbon (C), sulfur (S), strontium (Sr) and sodium (Na) concentrations. On each sample, 2D-mapping and 1D-cross-sectional transects were studied (Table 2). Cross-sectional transect analyses were quantitative, using calibrated standards: CaCO₃ (Ca and C), FeS₂ (S), SrSO₄ (Sr), and NaAlSi₃O₈ (Na). Mapping analyses were semi-quantitative. High concentrations are represented in red and low concentrations in blue. Results were similar for C6–C10. We chose to present one sample,

Table 2 Operating conditions for elemental analysis using WDS microprobe

	Cross-sectional transect	Mapping	Acquisition time (s)	Acquisition time (ms)	Detection limit (ppm)
Spot size (µm)	1	0.5–1			
Voltage (kV)	10	20			
Beam current (nA)	10	200			
Ca			40	100	509
C			40	100	2186
S			120	100	169
Sr			120	100	552
Na			120	100	246

Fig. 8 a Cross-sectional view of a totally repaired clam C6 (SRS 3) that has three distinct and successive brown deposits (*arrow*; two events were sampled), using a binocular microscope (magnitude $\times 9.10$); b–e ionic mapping acquired using a WDS microprobe of C6; b C mapping, c Ca mapping, d S mapping, e Sr mapping, f Na mapping; g reflected microscope photograph (magnitude $\times 4$) and h S, C, Ca, Sr, and Na cross-sectional transects; *O* outer, *I* inner, C-1: first deposit, C-2: second deposit



C6 (Fig. 8), with 3 successive BRD phenomena, visible in the shell section.

Quantification of the organic matrix

Non-BRD-affected clams and totally repaired clams were selected. All the shells were scrupulously brushed to remove epibionts. Non-BRD-affected shells were abraded in order to remove the outer layer (composite prismatic texture) and to keep the inner homogeneous layer (the surface adjacent to the mantle). The layer of totally repaired clams was sampled with a Dremel micro-saw and tweezers. Then, repaired and non-BRD-affected fragments were soaked in sodium hypochlorite solution (0.2 g of active chlorine/100 ml of water) for 12 h. In biomineralization studies, this treatment is currently performed for eliminating extraneous organic constituents bound to the surface of shell fragments, without dissolving the mineral phase or destroying the 'crystal-linked' shell organic matrix [58]. The fragment were subsequently rinsed with deionized water, and dried. Cleaned pieces of non-BRD-affected inner layer were briefly crushed into a shell powder using a "Pulverisette" mortar (Fritch) under liquid nitrogen. Because of the low quantity of BRD-repaired fragments, these were manually crushed in an agate mortar. Three different batches of non-BRD-affected inner layer powder (20.02 g, 30.00 g, and 16.89 g) and three batches of totally repair layer powder (2.03 g, 4.58 g and 4.94 g) were obtained. Powders were suspended in deionized water then cold acetic acid (5% v/v) was progressively added with an electronic burette at a flow rate of 100 μ l every 5 s. Decalcification was performed overnight at 4 °C and the final pH was about 4–4.2. The solution was centrifuged for 15 min at 3,900 \times g, and the residual insoluble organic matrix was rinsed several times with deionized water, then freeze-dried and weighed. The clear supernatant was filtered (5 μ m), and the volume was reduced to approximately 5 ml in an Amicon ultrafiltration cell with a YM10 Millipore membrane (cut-off of 10 kDa) at 4 °C. Complete desalting of the solution was accomplished by dialysis against water at 4 °C for 5 days in a Spectra/Por ready-to-used tube. For all of the batches, the solution containing the acido-soluble shell matrix was freeze-dried, and the resulting pellet was weighed. Because of the low amount of materials extracted from the repair layers, additional micro-BCA (BicinChoninic Acid assay) quantification was performed by using a Bio Rad DC protein assay in a microplate read at 750 nm. A standard curve was constructed by using a reference solution, which contained a known concentration of shell soluble matrix extracted from non-BRD-affected Manila clams. Normality and variance were tested using Cochran, Bartlett, Hartley, and Levene tests. An ANOVA test, at the 95% confidence level, was used. Otherwise, the non-parametric test Kruskal–Wallis was used.

Results

Raman micro-spectrometry

Surface investigations

The brown deposit (SRS 0) is characterized by a very high background luminescence intensity: a continuous background emission (100% intensity; Fig. 3). Several investigations were made on different spots of brown deposit and on different shells. Raman signal was always dominated by luminescence.

At 514.5 nm, the intensity of luminescence is very high between 1,000 cm^{-1} and 7,000 cm^{-1} and no vibrational peak of organic matrix is observed. It could be absent or masked by luminescence (Fig. 3). During the shell repair process (SRS 1, 2, and 3), the luminescence is still present and no vibrational peak of organic matrix appeared. However, this luminescence intensity decreases with the stage of the shell repair process (SRS 1, 44% and 31%; SRS 2, 11% then SRS 3, 6%, in relation to SRS 0). At the last stage (SRS3, 6%), the luminescence tends to remain more important than in non-BRD-affected clams (2%; Fig. 3).

Raman spectra cross-sectional transects

Cross-sectional transects confirm that the luminescence intensity is maximal in the brown deposit, and remains at a high level at the beginning of the shell repair process (C1–C5; Figs. 4, 5, and 6). Then the luminescence intensity slowly decreases, to reach the level observed in the non-BRD-affected inner layer (C1–C3; Figs. 4 and 6). The luminescence intensities in the three clams (C1–C3) after one disease event, seem to follow a similar evolution (Fig. 6). They dramatically decrease at the beginning of the shell repair, and then become stable, starting from a distance of 700–800 μ m after the brown deposit (C1–C3; Fig. 6). But in two cases a second luminescence phenomenon recurs. It is probably correlated to a second BRD episode (C4, on surface and C5, 40 μ m; Fig. 5), even if nothing was visible by microscopy. Between these two events, the luminescence slowly decreases but never reaches the non-BRD-affected inner layer level (Fig. 5). All the cross-sectional transects show that the inner layer located just before the brown deposit has always a high luminescence (C1, 1,805 μ m below the surface and C4, 200 μ m below the surface, Figs. 4, 5, and 6).

Organic matrix comparison

Raman spectra of mucus and of fresh periostracal lamina are very different from the one of the brown deposit (SRS 0). Raman spectra of *V. tapetis* and of old periostracal

Table 3 Concentrations of the trace elements S, C, Ca, Sr and Na (%w/w) of a adult clam C-6, measured before, during and after 2 disease events

% w/w	Element concentration						
	Stages	Distance	Sulfur	Carbon	Calcium	Strontium	Sodium
Before	–210 –15	μm	0.026%	13.28%	38.33%	0.044%	0.72%
Brown deposit 1	0	μm	0.17%	13.99%	37.43%	0.17%	0.70%
2 peaks	45	μm	0.24%	15.23%	36.51%	0.15%	0.050%
After	150 512	μm	0.018 0.13%	13.58%	38.57%	0.046 0.080%	0.78%
Brown deposit 2	542	μm	0.28%	18.49%	29.32%	0.14%	0.37%
2 peaks	722	μm	1.74%	24.65%	24.71%	0.20%	0.37%
After	858 1,024	μm	0.064 0.095%	13.39%	38.90%	0.13 0.059%	0.78%
Shell edge	1,054	μm	1.37%	36.20%	0.47%	0.13%	0.14%

lamina are more similar to the brown deposit spectrum from 0 to around 2,500 cm^{-1} (Fig. 7).

WDS microprobe

When resin, which surrounds the sample, is measured, the WDS microprobe signal shows a high carbon concentration and no sulfur, calcium, strontium, or sodium (Fig. 8). This signature is often present in the middle of the brown deposit. As, this layer is very friable, it is generally split in two parts and resin fills the split (Fig. 8). Results of each element are shown on Fig. 8 and resumed in Table 3.

Sulfur

Sulfur concentration is always high in the brown deposit. It often forms two peaks for the disease events (Fig. 8). Before the brown deposit, sulfur concentration is low and shows a high variability. After the brown deposit, during the shell repair, S concentration stays at a quite high level and then slowly decreases. The sulfur concentration often increases at the shell edge. This increase may be correlated to the proximity of the periostracal lamina (Fig. 8, Table 3).

Carbon

During the brown deposit, the carbon concentration always shows two peaks in the same place as sulfur ones. C concentration is similar after and before the brown deposit and is very stable. This concentration is high at the shell edge linked to the periostracal lamina (Fig. 8, Table 3).

Calcium

In the brown deposit, calcium concentration is low whereas the concentration is high, stable and similar in the non-BRD-affected inner layer and in the repair layer. It often decreases in the periostracal lamina (Fig. 8, Table 3).

Strontium

Strontium concentration is high in the brown deposit and forms two peaks similar to sulfur. However, strontium is irregularly distributed and sometimes increases in the periostracal lamina (Fig. 8, Table 3).

Sodium

Sodium concentration often decreases during the second peak of S concentration in the brown deposit. This element level is quite stable and similar before and after the brown deposit (Fig. 8, Table 3). Sodium is never observed in the periostracal lamina.

In summary, during the brown deposit, S, C, and Sr concentrations increase and form two peaks, while the concentrations of Ca and Na decrease (Fig. 8, Table 3). Additionally, the signature of periostracal lamina is similar to that of the brown deposit, qualitatively and quantitatively.

Quantification of the organic matrix

Following the dissolution of the shell powder with cold dilute acetic acid, and the centrifugation of the resulting solution, the extraction procedure provided two sets of organic shell components: an acid-insoluble matrix and an acid-soluble one. The inner shell layer of non-BRD-affected clams is composed of $0.18 \pm 0.11\%$ (average \pm standard deviation w/w %) of insoluble organic matrix and of $0.0388 \pm 0.0053\%$ (w/w %) of soluble organic matrix, which means an insoluble/soluble ratio about 5. Both combined matrices represent $0.22 \pm 0.10\%$ (w/w %) of shell powder, the remaining part (99.8%) being the calcium carbonate phase.

Similar to the non-BRD-affected shell layers, the soluble and insoluble matrices were extracted from three batches of repair layers, i.e., of layers secreted above BRD. The mean percentage values for insoluble versus soluble matrices are, respectively, $3.48 \pm 2.62\%$ (w/w %) and $0.00961 \pm 0.00702\%$ (w/w %). However, from batch to batch, a wide disparity of

the values is observed in the insoluble/soluble ratio, which ranges from 75 (batch 3) to more than 2000 (batch 1). The repair layer compared to the inner layer can be statistically characterized by, firstly, a significantly higher quantity of both total organic matrix (p 0.0495<0.05, Kruskal–Wallis) and insoluble organic matrix (p 0.0495<0.05, Kruskal–Wallis) and secondly, a lesser quantity of soluble organic matrix (p 0.0095<0.05, ANOVA).

Discussion

Our analysis allows distinguishing three stages: before, during, and after the brown deposit.

Before the brown deposit

At this stage (23 μm to 410 μm before BRD), Raman spectra showed that luminescence is already high [59], suggesting that the inner layer may be modified by the bacteria before the macroscopic appearance of the brown deposit. This thin shell layer is hardly visible using an optical microscope ($\times 100$); it is not colored and does not seem organic. It is difficult to determine a duration from a thickness because the daily growth rate of the non-BRD-affected inner layer of clam varies with the age and the position on the shell, and because the mineralization of the inner layer is disrupted before, during and after the brown deposit. To date, this modified inner layer has never been described. Our results differ from the study by Paillard et al. [21] in which no modification on the inner surface of the shell was observed, using SEM, 12 h after a *V. tapetis* injection (before the brown deposit appearance). Bacteria were observed on the periostracal lamina but not directly on the inner layer [21].

During the brown deposit

The BRD is characterized by a high luminescence intensity on Raman spectra, and by a variation in trace elements concentrations, using WDS microprobe mapping and cross-sectional transects: an increase of S, C, and Sr and a decrease of Ca and Na concentrations.

Luminescence is generally due to specific organic compounds which can scatter the light [60]. This phenomenon has also been called photoluminescence [61], background [35, 61, 62], or fluorescence [35, 60]. Bell et al. [60] showed that this luminescence can be due to organic compounds such as colored compounds with chromophores or fluorescent compounds [60]. The presence of luminescence had also been observed in 1975 in bovine lenses [61] and was used for measuring the amide I concentration. Raman was also used to determine the chemical composition

of Permian fossil plants from Chemnitz. Luminescence was observed in place of carbonaceous material, constituted from celluloses and lignins [62]. In the bivalve *Pinctada margarifera*, Raman spectrum of a shell nacre nucleus presented a high luminescence intensity, which was explained by the presence of organic matter [35]. To conclude, although the luminescence certainly masks vibrational peaks because its signal is higher, it can be used as a marker of the luminescent organic matrix.

Sulfur is not present in crystals but in the organic matrix framework which surrounds them [12]. High concentrations of S are found in sulfated sugars [1, 2, 4–6, 8–10, 12, 45, 63, 64] and in proteins which contain sulfated amino acids [3, 6, 7, 11, 65]. In 2003, Dauphin et al. [6] showed that in organic mineralizing matrices, chemical bonding of sulfur can occur in three possible forms: C–S in amino acids (in cysteine and methionine), S–S disulfide bridges (in cystine) and SO_4 in sulfated sugars. All these possibilities were observed in the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis* and the Polynesian pearl oyster *P. margarifera*, using XANES (scanning X-ray microscope) maps and cross-sectional transects, and SO_4 form was dominant [6]. Earlier, in 1986, Cuif et al. [12], had shown a high S concentration in these two species using an energy dispersive spectrometer microprobe [12]. Using XANES, Guzman et al. [4] had clearly demonstrated that the rhythm of sulfated sugars secretion in the Chilean abalone *Concholepas concholepas* shell was correlated to a periodicity of the growth layers. They consequently suggested that these components were associated with the mineralization process [4]. Sulfur-containing macromolecules have been characterized in a number of cases but their exact function remains elusive: past studies show the presence of sulfated polysaccharides, in particular in the eastern oyster *Crassostrea virginica* shell [9], or in the central region of the nacreous tablets of the cephalopod *Nautilus pompilius* where these macromolecules are supposed to nucleate crystals [45]. Alternatively, some old works evidenced the presence of glycoprotein fractions containing sulfated sugars, like the one found in the EDTA-soluble shell matrix of the hard clam *Mercenaria mercenaria* [63], or the fraction analyzed from the macro-prismatic unionid bivalve: the freshwater mussel *Lamellidans marginalis* [16]. Recent works confirmed these findings [7, 8, 13]. In particular, data based on protein sequences showed that some proteins, such as pelwapin or lustrin A, are enriched in cysteine residues [3, 11]. In 1989, Gouletquer showed that in the *R. philippinarum* there was more cysteine in the soluble organic matrix and more methionine in the insoluble one, in the repair layer than in the brown deposit or in shells of non-BRD-affected clams. Furthermore, there was more cysteine in the insoluble organic matrix of the brown deposit than in the repair layer or the shells of non-BRD-affected clams [66].

Carbon is present both in calcium carbonate (CaCO_3) and in organic matrix components such as proteins, carbohydrates, or lipids. Strontium has the same ionic radius as calcium and can partially replace it in biominerals. Its incorporation depends on growth rate, shell microstructure, maturity of the animal and on environment factors, such as salinity or Sr/Ca ratio in environmental water [38–40, 47, 48]. In biominerals, Ca and sodium are present in calcium crystals, in particular in aragonite for Na [12], while they are absent during the BRD process.

Luminescence and trace elements concentration results are complementary and suggest that the brown deposit is fully organic. This hypothesis is supported by observations on SEM, where it appeared like a thick organic layer which laid down on the inner layer of the shell [21–23].

Raman spectra showed that *V. tapetis* and the old periostracal lamina have similar signatures as the brown deposit signal, from 0 cm^{-1} to around 2500 cm^{-1} . On one hand, the brown deposit signal could be interpreted as a mixing of the bacterial and old periostracal lamina signatures. On the other hand, using SEM, Trinkler et al. (2009) showed that *V. tapetis* was rarely observed on the brown deposit [23] but can be embedded in it [67]. Furthermore, ionic composition of periostracal lamina obtained using WDS microprobe is very similar to that of the brown deposit one. This suggests that the old periostracal lamina could be an important part of the brown deposit.

Paillard et al. using SEM, have formulated the hypothesis that during a BRD infection, bacteria grow on the periostracal lamina and cause it to deteriorate. The deterioration of the periostracal lamina would represent the first stage of biomineralization disturbance at the growing edge, would result in the interruption of the biomineralization process, followed by the beginning of the deposition of the brown ring [21, 22, 67].

During the shell repair

After the brown deposit, the luminescence and the S concentration stay at a quite high level. Then, both signals decrease from $0\text{ }\mu\text{m}$ to $450\text{--}800\text{ }\mu\text{m}$ reaching the level of the non-BRD-affected inner layer. Raman and WDS microprobe results show that in the repair layer, more specific organic compounds are found, such as luminescent or sulfated ones, than in the non-BRD-affected inner layer. Furthermore, the total organic matrix in the repair layer has a higher percentage and a higher proportion of insoluble matrix than in the non-BRD-affected inner layer. This suggests a change in the matrix secretory regime during the repair process. Luminescence intensity and S concentration profiles agree with the fact that organic matrix level is high during the brown deposit period and decreases during the

shell repair biomineralization to finally reach the non-BRD-affected inner layer level.

Previous studies showed that clams recover as soon as the repair layer entirely covers the brown deposit (SRS 3) without taking account of the repair layer thickness [15, 68]. In our study, clams often displayed disease signs two or three times before all tracers reached the non-BRD-affected inner layer characteristics. A first hypothesis is that clams are attacked by *V. tapetis* a second time and a second brown ring appears. The second hypothesis is that if *V. tapetis* is surrounded by only a thin repair layer; it might be able to escape this barrier and could attack again its host. So, it would be important to integrate the repair layer thickness in the definition of clams' recovery after a BRD.

Conclusions

In conclusion, Raman spectrometry and WDS microprobe are powerful and complementary tools to characterize spatially the role of the organic matrix of manila clams during the brown deposit phase of the brown ring disease and its subsequent and its shell repair phase. The organic matrix quantification brings additional results by documenting the fact that the matrix of the repair zone is different (in its amounts), from that of non-BRD-affected zones, a fact that may translate a drastic change of the secretory regime of the calcifying mantle during shell repair.

It is now possible to better understand the mechanism of the brown deposit and its shell repair. (1) Just after a *V. tapetis* attack and before appearance of the brown deposit, bacteria attach on the periostracal lamina and modify the inner layer creating the luminescence signal. (2) During the brown deposit, the periostracal lamina deteriorates and the biomineralization stops. This brown deposit is organic, thick and contains luminescent and sulfated compounds. (3) After the brown deposit, the shell repair process begins. The mantle tissues precipitate calcium carbonate crystals on the brown deposit until the affected zone is fully covered. The repair organic matrix is subsequently precipitated. The biomineralization continues and this repair layer thickens. During this stage, the organic matrix stays at a high concentration in the shell (evidence by the presence of luminescent and sulfated compounds), which indicates a change in the secretory regime in comparison to a non-BRD situation. Later, after $450\text{--}800\text{ }\mu\text{m}$ of repair layer has been deposited, the situation comes to a steady state except when a second infection occurs. Our next step is to study more precisely the biochemical differences between the organic matrix of the repair layer and the non-BRD-affected zone, together with a precise analysis of the shell repair layer.

Acknowledgments We would like to thank Eric Dabas and André Ogor for shell preparations for the WDS microsonde, and Nathalie Guichard for shell matrix extractions and quantifications.

References

- Nudelman F, Gotliv BA, Addadi L, Weiner S (2006) *J Struct Biol* 153:176–187
- Addadi L, Moradian J, Shay E, Maroudas NG, Weiner S (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2732–2736
- Treccani L, Mann K, Heinemann F, Fritz M (2006) *Biophys J* 91:2601–2608
- Guzman N, Ball A, Cuif JP, Dauphin Y, Denis A, Ortlieb L (2007) *Microsc Microanal* 13:1–7
- Marie B, Luquet G, Pais De Barros JP, Guichard N, Morel S, Alcaraz G, Bollache L, Marin F (2007) *Febs J* 274:2933–2945
- Dauphin Y, Cuif JP, Doucet J, Salome M, Susini J, Williams CT (2003) *J Struct Biol* 142:272–280
- Marin F, Luquet G, Marie B, Medakovic D (2008) *Curr Top Dev Biol* 80:209–276
- Wada K (1980) Initiation of mineralization in bivalve molluscs. In: Omori M and Watabe N (eds) *The mechanisms of mineralization in animals and plants, proceedings of the Third International Biomineralization Symposium*. Tokai University Press, Tokai
- Simkiss K (1965) *Comp Biochem Physiol* 16:427–435
- Miyashita T, Miyamoto H and Matsushiro A (2003) Expression of pearl in *Escherichia coli*, a protein which participates in the nacreous layer formation of *P. fucata* pearls. In: Kobayashi I and Ozawa H (eds) *Biomineralization (biom 2001), formation, diversity, evolution and application, Proceedings of the 8th symposium on biomineralizations*. Tokai University Press, Kanagawa, 176–177
- Shen X, Belcher AM, Hansma PK, Stucky GD, Morse DE (1997) *J Biol Chem* 272:32472–32481
- Cuif JP, Dauphin Y, Flamand D, Frerotte B, Gautret P (1986) *C R Acad Sc Paris* 303(série II):251–256
- Cheng TC (1967) *Adv Mar Biol* 5:60–80
- George CD (1966) *Aust Gemmol* 8:10–26
- Paillard C, Maes P (1994) *Dis Aquat Org* 19:137–146
- Breber P (1985) *Oebelia* 11:153–159
- Flassch JP, Leborgne Y (1992) Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese Manila clam (*Tapes philippinarum*) and effects on aquaculture production and natural settlement. ICES Marine Symposium 194, Halifax, 92–96
- Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, Garcia MT, Ventosa A (1996) *Int J Syst Bacteriol* B 46:480–484
- Paillard C, Maes P (1990) *C R Acad Sci Paris, Série III* 310:15–20
- Paillard C (2004) *Aquat Living Resour* 17:467–475
- Paillard C, Maes P (1995) *J Invertebr Pathol* 65:91–100
- Paillard C, Maes P (1995) *J Invertebr Pathol* 65:101–110
- Trinkler N, Sinquin G, Querne J, Paillard C (2009) *J Invertebr Pathol* Submit
- Jolivet A, Bardeau JF, Fablet R, Paulet YM, De Pontual H (2008) *Anal Bioanal Chem* 392:551–560
- Jacobs DE, Soldati AL, Wirth R, Huth J, Wehrmeister U, Hofmeister W (2008) *Geochim Cosmochim Acta* 72:5401–5415
- Takeuchi T, Sarashina I, Iijima M, Endo K (2008) *FEBS Lett* 582:591–596
- Hedegaard C, Bardeau JF, Chateigner D (2006) *Journal of Molluscan studies* 72:157–162
- Yan Z, Jing G, Gong N, Li C, Zhou Y, Xie L, Zhang R (2007) *Biomacromolecules* 8:3597–3601
- Jing G, Yan Z, Li Y, Xie L, Zhang R (2007) *Mar Biotechnol* 9:650–659
- Urmos J, Sharma SK, Mackenzie FT (1991) *Am Mineral* 76:641–646
- Lécuyer C, Reynard B, Martineau F (2004) *Chem Geol* 213:293–305
- Weiss IM, Tuross N, Addadi L, Weiner S (2002) *J Exp Zool* 293:478–491
- Gotliv BA, Addadi L, Weiner S (2003) *ChemBioChem* 4:522–529
- Withnall R, Chowdhry BZ, Silver J, Edwards HG, de Oliveira LF (2003) *Spectrochim Acta Part A* 59:2207–2212
- Rousseau M, Lopez E, Couté A, Mascarel G, Smith DC, Naslain R, Bourrat X (2005) *J Struct Biol* 149:149–157
- Brink DJ, Van Der Berg NG (2005) *J Phys D: Appl Phys* 38:338–343
- Zhang G, Xie X, Wang Y (2001) *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi* 21:193–196
- Takesue RK, Bacon CR, Thompson JK (2008) *Geochim Cosmochim Acta* 72:5431–5445
- Klein RT, Lohmann KC, Thayer CW (1996) *Geochim Cosmochim Acta* 60:4207–4221
- Stecher HA III, Krantz DE, Lord CJ III, Luther GW III, Bock KW (1996) *Geochim Cosmochim Acta* 60:3445–3456
- Marin F, Luquet G, Marie B, Medakovic D (2008) *Curr Top Dev Biol* 80:209–76
- Coote GE, Trompeter WJ (1995) *Nucl Instr and Meth in Phys Res B* 104:333–338
- Kuczumow A (2004) *J Alloys Compd* 362:71–82
- Lingh U, Mutvei H, Sunde T, Westermark T (1988) *Nucl Instr and Meth in Phys Res B* 30:388–392
- Crenshaw MA, Ristedt H (1976) The histochemical localization of reactive groups in septa nacre from *Nautilus pompilius* L. In: Watabe N, Wilbur KM (eds) *The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants*. University of South Carolina Press, USA
- Fujikura K, Okoshi K, Naganuma T (2003) *Mar Ecol Prog Ser* 257:295–301
- Labonne M, Morize E, Scolanp R, Lae R, Dabas E, Bohn M (2009) *Estuar Coast Shelf Sci* 82:673–682
- Diouf K, Panfili J, Labonne M, Aliaume C, Tomas J, Do Chi T (2006) *Environ Biol Fishes* 77:9–20
- Gunn JS, Harrowfield IR, Proctor CH, Thresher RE (1992) *J Exp Mar Biol Ecol* 158:1–36
- Tzeng WN, Severin KP, Wickström H (1997) *Mar Ecol Prog Ser* 149:73–81
- Otake T, Ishii T, Ishii T, Nakahara M, Nakamura R (1997) *Mar Biol* 128:565–572
- Otake T, Ishii T, Nakahara M, Nakamura R (1994) *Mar Ecol Prog Ser* 112:189–193
- Markwitz A, Grambole D, Herrmann F, Trompeter WJ, Dioses T, Gauldie RW (2000) *Nucl Instr and Meth in Phys Res B* 168:109–116
- Elfman M, Limburg KE, Kristiansson P, Svedang H, Westin L, Wickstrom H, Malmqvist K, Pallon J (2000) *Nucl Instr and Meth in Phys Res B* 161–163:877–881
- Radtke RL, Townsend DW, Kinzie RA III, Fey D (1999) *J Exp Mar Biol Ecol* 238:21–27
- Dauphin Y, Cuif JP, Massard P (2006) *Chem Geol* 231:26–37
- Marin F, Smith M, Isa Y, Muyzer G, Westbroek P (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1554–1559
- Gaffey SJ, Bronnimann CE (1993) *J Sedim Petrol* 63:752–754
- Capozzi V, Pema G, Gallone A, Biagi PF, Carmone P, Fratello A, Guida G, Zanna P, Cicero R (2005) *J Mol Struct* 744–747:717–721
- Bell SEJ, Bourguignon ESO, Grady AO, Villamie J, Dennis AC (2002) *Raman Spectroscopy* 14:17–20
- Schachar RA, Solin SA (1975) *Invest Ophthalmol* 14:380–396
- Witke K, Götze J, Robler R, Dietrich D, Marx G (2004) *Spectrochim Acta Part A* 60:2903–2912

63. Crenshaw MA (1972) *Biomaterial Res Rep* 6:6–11
64. Marxen JC, Becker WE (1997) *Comp Biochem Physiol* 118:23–33
65. Ravindranath MH, Rajeswari Ravindranath MH (1974) *Acta Histochem.* 48:26–41
66. Gouletquer P (1989) Etude des facteurs environnementaux intervenant sur la production de la palourde japonaise d'élevage *Ruditapes philippinarum*. Thesis, Université de Bretagne Occidentale, Brest
67. Paillard C, Maes P, Oubella R (1994) *Annu Rev Fish Dis* 4:219–240
68. 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. Proceedings of the VIIIe Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, AEEMA, Paris, France, 14031-14033

Chapitre 5. La variabilité de la réparation coquillière chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* affectée par la Maladie de l'Anneau Brun : une étude biochimique, sérologique et microstructurale

Article 4: Variability of Shell repair in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affected by the Brown Ring Disease: a study on the organic shell matrix

Article 5: Shell repair in the clam *Ruditapes philippinarum*, affected by the Brown Ring Disease (BRD): a biochemical and serological study

Les chapitres précédents ont permis d'observer que la microstructure de la couche de réparation coquillière était différente de celle d'une couche interne saine (articles 1 et 2). De plus, une caractérisation très fine de la matrice organique coquillière durant le dépôt brun et la réparation coquillière a été présentée dans l'article 3. Des molécules organiques luminescentes au Raman et sulfatées ont été spécifiquement identifiées dans le dépôt brun ainsi que dans la couche de réparation coquillière et peu dans la couche interne saine.

Le but de ce cinquième chapitre est de poursuivre la caractérisation du processus de la réparation coquillière en comparant les microstructures des zones de réparation avec celles des coquilles non affectées par la MAB. De plus, les matrices organiques coquillières associées aux palourdes non affectées et réparées ont été extraites et comparées par des techniques biochimiques et immunologiques.

Nos résultats montrent que les zones réparées présentent des microstructures qui ressemblent à la microstructure homogène spécifique de la couche interne non affectée, mais avec quelques différences marquées, comme le développement de cristaux aciculaires croisés organisés en chevrons. Dans les 3 lots testés de coquilles réparées, les matrices organiques des couches de réparations prélevées montrent certaines hétérogénéités. En effet, ces matrices

peuvent être partiellement ou totalement différentes de celles de coquilles non affectées. Ceci est illustré par les électrophorèses SDS-PAGE et par les comparaisons sérologiques.

Nos résultats suggèrent fortement une modification du régime sécrétoire des cellules calcifiantes du manteau pendant le processus de réparation coquillière. Les anticorps polyclonaux qui ont été développés spécifiquement contre des fractions protéiques de coquilles non affectées représentent des outils intéressants pour localiser par immunohistologie les cellules responsables de la réparation et par immunogold les fractions organiques spécifiques dans les microstructures coquillières.

Un article traitant de cette étude a été soumis dans le journal *Physiological and Biochemical Zoology*. Un autre article a été accepté et est publié dans les proceedings du 2009 *MRS Spring Meeting*. Sa référence est : Materials Research Society (MRS) Symposium Proceedings, Structure-Property Relationships in biomineralized and Biomimetic Composites, Spring meeting 2009, San Francisco, 13-17 April 2009, vol. 1187, p. 89-94.

1 **Variability of shell repair in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affected by the**
2 **Brown Ring Disease: a study on the organic shell matrix**

3

4 Nolwenn Trinkler^{1,*}, Nathalie Guichard^{2,3}, Maylis Labonne¹, Laurent Plasseraud^{3,4}, Christine
5 Paillard¹, and Frédéric Marin^{2,3,*}

6

7 1 : IUEM, UMR CNRS 6539, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

8 2 : UMR 5561 CNRS, Biogéosciences, 21000 Dijon, France

9 3 : Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France

10 4 : ICMUB, UMR CNRS 5260, Faculté des Sciences Mirande, 21000 Dijon, France

11

12 • Corresponding authors: Nolwenn Trinkler; e-mail: nolwenn.trinkler@univ-brest.fr;

13 tel: 33 (0)6 31 76 99 48; fax: 02 98 49 86 45;

14 • Frédéric Marin; e-mail: Frederic.marin@u-bourgogne.fr; tel: 33 (0)3 80 39 63 72; fax:

15 33 (0)3 80 39 63 87.

1 **ABSTRACT** : For more than two decades, the Manila clam *Ruditapes philippinarum* has
2 been regularly affected by Brown Ring Disease (BRD), an epizootic event caused by the
3 bacterium *Vibrio tapetis* and characterized by the development of a brown deposit on the
4 inner face of valves. Although BRD infection is often lethal, some clams recover by
5 mineralizing a new repair shell layer, which covers the brown deposit and fully isolates it
6 from living tissues. In order to understand this specific shell repair process, the
7 microstructures of repaired zones were compared to those of shells unaffected by BRD. In
8 addition, the organic matrix associated with unaffected shells and to repair patches were
9 extracted and compared by biochemical and immunological techniques. Our results show that
10 the repaired zones exhibit microstructure that resemble the so-called homogeneous
11 microstructure of the internal layer, with some marked differences, like the development of
12 crossed-acicular crystals, which form chevron-like patterns. In the three tested batches of
13 repaired layers, the matrices exhibit certain heterogeneity, i.e., they are partially to widely
14 different from the ones of shells unaffected by BRD, as illustrated by SDS-PAGE and by
15 serological comparisons. Our results strongly suggest a modification of the secretory regime
16 of calcifying mantle cells during the shell repair process. Polyclonal antibodies, which were
17 developed against specific protein fractions of the shell, represent relevant tools for localizing
18 by immunohistology the cells responsible for the repair.
19

1 **Introduction**

2 The molluscan shell is a remarkable example of calcium carbonate biomineralization,
3 synthesized outside living tissues. According to classical views, the shell results from a subtle
4 chemistry between the precursor mineral ions that are extruded in the extrapallial space and
5 the numerous macromolecular extracellular components produced by the mantle epithelial
6 cells, i.e., proteins and polysaccharides. All these components react in a well-coordinated
7 manner. From this self-assembling process emerge solid and compact microstructures such as
8 nacre, prisms, crossed-lamellar or homogeneous textures (Checa and Rodriguez-navarro
9 2005; Marin et al. 2008).

10 One peculiarity that makes the molluscan shell an appealing model to study lies in its
11 ability to self-repair after shell damage. Artificially induced repair processes have been
12 studied in a number of cases, after shell cutting (Caseiro and Gauthier 1997) or shell drilling
13 (Caseiro and Gauthier 1998; Fleury et al. 2008; Kapur and Sen Gupta 1970). In natural
14 environments, the shell repair process frequently takes place after accidental shell breakage,
15 shell boring by epibionts (Huchette et al. 2006; Marshall and Day 2001; Nollens et al. 2002),
16 or predation by fishes. One particular case of natural repair occurs when the mollusk has to
17 overcome a bacterial infection of the shell, including the periostracal layer. The Manila clam
18 *Ruditapes philippinarum* provides such an example. In western Europe, this specie is infected
19 by a bacterium, *Vibrio tapetis* (Paillard and Maes 1990), that colonizes the clam by, first,
20 adhering to the periostracal lamina, then, by penetrating into the extrapallial fluids (Paillard
21 2004). At this stage, the most visible effect of the infection is the secretion by the mantle
22 tissues of a brown organic deposit -“the Brown Ring Disease”, also called BRD- on the inner
23 and peripheral surface of the shell (Paillard and Maes 1990, 1995a, b). When the hemolymph
24 and the soft tissues are colonized by the bacterium, the clam rapidly dies. This leads to mass
25 mortalities in cultured clam populations, in particular during winter. Clams that overcome the
26 infections are the ones that can isolate the brown ring deposit from mantle tissues by
27 producing a mineralized repair layer over it. This specific process of shell repair has just now
28 started to be documented from a microstructural and biochemical viewpoint (Trinkler et al.
29 2010; Trinkler et al. 2009a; Trinkler et al. 2009b; Trinkler et al. 2009c).

30 In the present paper, we have investigated the microstructure, biochemistry, and
31 serology of non-BRD-affected shells of the clam *Ruditapes philippinarum*, and compared
32 these data to those obtained on repaired zones of the shell, in three clam batches affected by
33 the BRD. To our knowledge, this is the first study of this type. Our results show that the
34 matrices associated to the repair zones are different to a certain degree from the shell matrix

1 of non-BRD-affected specimens. Furthermore, from batch to batch, they exhibit variability, a
2 phenomenon, which has to be correlated with the ‘non-standard’ functioning of the mantle
3 epithelium in abnormal shell repair situations. Our study is a prerequisite for the elaboration
4 of molecular markers that may be useful for characterizing the shell repair process at the
5 cellular level.

6

7 **Materials and methods**

8 *Sample collection and SEM observations*

9 All diseased animals were collected in a single locality, Landeda (Finistère, Brittany,
10 France), the place where the first clam mass mortalities were recorded in 1987 (Flassch et al.
11 1992; Paillard and Maes 1990). Non-BRD-affected animals were collected in the Morbihan
12 gulf (“Ile aux Oiseaux”), where clam populations exhibit a low prevalence for BRD (Flye
13 Sainte Marie *et al.* 2009). Animals were sacrificed and the soft tissues were separated from
14 the shells, which were directly observed under a binocular microscope to check for the
15 presence of the BRD and of the repair patch. Shells were sorted according to their degree of
16 shell repair: non-BRD-affected shells, partly repaired shells and fully repaired shells. For this
17 last category, we considered that the repair process was complete when the infected zone was
18 entirely covered by a mineralized patch.

19 In the laboratory, shells were thoroughly cleaned with tap water. For SEM
20 observations, non-BRD-affected shells were cleaned and cut, and fresh sections were
21 observed, with or without slight etching with EDTA (1% w/vol, 2-5 min.) or acetic acid (10%
22 vol/vol, 20 sec to 2 min.). Repair patches were mechanically separated from the shell with a
23 micro saw and precision tweezers. Some repair patch sections were observed directly, or after
24 etching with EDTA (1%, 2 or 6 min.) using SEM. All samples were carbon sputtered and
25 observed with a JEOL JSM 6400F Scanning Electron Microscope (SEM) under a 10-15 KeV
26 beam, or with a Philips ESM XL30 La B6. In addition, repaired shell samples were embedded
27 in epoxy; mirror-polished sections were made and subsequently etched in EDTA (1% w/vol)
28 for three minutes before being carbon sputtered.

29

30 *Shell matrix extraction and quantification*

31 Non-BRD-affected whole shells were scrupulously brushed and abraded to remove the
32 outer thin “composite prismatic” layer and the hinge. They were crushed into small
33 fragments, and the fragments were soaked in dilute sodium hypochlorite (0.26% active
34 chlorine) overnight to remove potential surface contaminants. They were then thoroughly

1 rinsed with water and dried, before being crushed in a laboratory mortar grinder (Pulverisette
2 2, Fritsch) under liquid nitrogen. The powder was sieved on a 200 μ m mesh to remove coarse
3 fragments.

4 For diseased shells, we used three different batches of isolated repair zones of
5 respectively 2.03 g (batch 1), 4.58 g (batch 2) and 4.94 g (batch 3). Each of these batches
6 corresponds to a pool of infected specimens (few hundreds), sampled at the same period:
7 January 2008, for batch 1, May 2008 for batch 2 and July 2008 for batch 3. The three batches
8 exhibit similar fully repaired patches. These three batches were treated similarly: they were
9 cleaned overnight with sodium hypochlorite, rinsed and dried. Because of the small quantity
10 of material obtained, the repair patch fragments were reduced to fine powder manually in an
11 agate mortar.

12 For all samples, the matrix extraction was performed as follows: the powders (2.03 g
13 for batch 1 to 30 g for non-BRD-affected shells) were suspended in distilled water, to which
14 cold acetic acid (5% v/v) was progressively added with an electronic burette (Titronic), at a
15 rate of 100 μ l every 10 seconds, until the pH was 4. Decalcification was performed overnight
16 at 4°C. The solutions were centrifuged 15 min at 3900 g. This operation led to the
17 identification of an insoluble organic fraction and of a supernatant containing the soluble
18 macromolecules. The supernatant was kept aside while the insoluble pellet was resuspended
19 several minutes in acetic acid solution, to check that the decalcification was complete. The
20 acid solution containing the insoluble fraction was centrifuged again (7 min., 3900 g), and the
21 supernatant, added to the first one. The pellet was subsequently suspended in distilled water
22 and rinsed through four centrifugation-suspension cycles. Each time the new supernatants
23 were added to the supernatant solution. The insoluble pellet was then freeze-dried. The
24 complete supernatant containing soluble macromolecules was filtered (5 μ m), and its volume
25 reduced to few milliliters by ultrafiltration on an Amicon membrane (YM10, cutoff 10 kDa)
26 at 4°C. Complete desalting of the concentrated supernatant was achieved by dialysis in a
27 Spectra/Por ready-to-use tube against distilled water at 4°C for four days, including several
28 water changes. The concentrated solution, free of salts, was freeze-dried.

29 The shell matrices, both soluble and insoluble, were quantified by weighing the
30 lyophilized pellets on a precision balance. For the soluble matrices associated with repaired
31 zones (batches 1-3), the amount found, below 500 μ g, was too low for direct weighing.
32 Consequently, the matrix was quantified by a standard Bio Rad DC protein assay in a
33 microplate reader at 750 nm. The standard curve was obtained by using as a reference a
34 mother solution of shell soluble matrix extracted from the homogeneous layer of non-BRD-

1 affected shells. The concentration of this latter solution was determined directly by dissolving
2 known amounts of lyophilisate in distilled water.

3

4 *Bulk analyses on shell matrices: FTIR and serological comparisons*

5 The bulk shell matrices of diseased shells, and non-BRD-affected shells were
6 compared using two complementary techniques adapted to the soluble/insoluble nature of the
7 matrix samples: FTIR (Fourier Transform Infra-Red) spectrometry was applied to insoluble
8 macromolecules and ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) to soluble ones. In this
9 latter case, lyophilisates of the soluble matrices were resuspended in milli-Q water to a final
10 concentration of 4µg/µl for the non-BRD-affected samples, and 1µg/ml for the three extracts
11 of the BRD-affected samples.

12 For FTIR comparisons, small amounts of lyophilisates of the insoluble matrices
13 (<1mg) were analyzed on a Bruker Vector 22 spectrometer (Institut de Chimie Moléculaire de
14 l'Université de Bourgogne, SYMCAT team) equipped with a Specac Golden Gate™ ATR
15 device in the wave-number range of 4000-500 cm⁻¹. For each sample, 10 scans were acquired
16 at a 2 cm⁻¹ resolution. Results were interpreted manually.

17 Serological comparisons were performed according to standard ELISA (Clark and
18 Adams 1977), involving antigen fixation, blocking with gelatin, 1st antibody binding, 2nd
19 antibody (AP-conjugate) binding, staining with substrate and data acquisition by a
20 spectrophotometric reading at 405 nm. Rinsing steps were performed after antigen fixation,
21 and after 1st and 2nd antibody incubations. Known amounts of acetic acid-soluble matrices
22 (from non-BRD-affected and repaired zones) were serially diluted (100 to 12.5 ng per well) in
23 96 well microplates (Nunc Maxisorb). As first antibodies, we used a selection of polyclonal
24 antibodies elicited against different molluscan acetic acid-soluble shell matrices, which cross-
25 react with the soluble shell matrix of *Ruditapes philippinarum*. These antibodies, which were
26 used in previous studies (Marie et al. 2008; Marin et al. 1994; Muyzer 1988), were anti-
27 soluble matrix from *Pinctada margaritifera*, anti-soluble matrix from *Mercenaria*
28 *mercenaria*, anti-soluble matrix from *Bathymodiolus* sp., anti-P95, a soluble protein of the
29 shell of *Unio pictorum*.

30

31 *Shell matrix analysis on SDS-PAGE*

32 The soluble matrices were diluted with an equal volume of 2x Laemmli sample buffer
33 (LSB) (Laemmli 1970) containing β-mercaptoethanol, and heat denaturated (100°C) for 5
34 min. Small aliquots (10 µg per well) were run on 12% discontinuous mini polyacrylamide

1 SDS-PAGE gels (Mini-Protean 3, Bio-Rad). The gels were directly stained with silver nitrate,
2 according to (Morrissey 1981). Aliquotes of the insoluble matrices were suspended in water
3 to which an equal volume of 2xLSB was added. The preparations were heat denatured for 8
4 minutes. Only a part of the insoluble matrix further solubilized with this treatment: it
5 corresponds to the acetic acid-insoluble/Laemmli-soluble extract.

6 We also compared the electrophoretic profiles of our extracts, both insoluble and
7 soluble, with Laemmli-soluble extracts from brown rings. These latter were directly peeled
8 off from the diseased shells, with a scalpel, and cleaned with EDTA (5% w/vol.) overnight,
9 then rinsed with distilled water. The brown ring extract was then bleached one hour with
10 sodium hypochlorite (0.026 active chlorine) to remove contaminants. It was rinsed with
11 distilled water, dried, crushed in liquid nitrogen, and treated with Laemmli buffer.

12

13 *Polyclonal antibodies against proteins of non-BRD-affected shell soluble matrix*

14 Following the results of the mini-SDS-PAGE on non-BRD affected extracts, we
15 decided to isolate some shell proteinaceous fractions for generating polyclonal antibodies. To
16 this end, large amounts of soluble matrix (139 mg) were extracted from 30 g powder of non-
17 BRD-affected shells and submitted to a fractionation by preparative gel electrophoresis
18 (Marin 2003; Marin et al. 2001) on a Bio-Rad Prep Cell (model 491). Several soluble
19 fractions were collected and tested on dot-blot with a cross-reacting antibody (anti-P95 from
20 *Unio pictorum*, Marie *et al.*, 2008). Four fractions were obtained, against which polyclonal
21 antibodies were elicited in guinea pigs, according to an accelerated 28-days immunization
22 program (Eurogentec, Belgium). The respective titers of the different antibodies were
23 determined by standard ELISA (Clark and Adams 1977). The antibodies were subsequently
24 tested by two techniques: ELISA and Western blot. For ELISA, the test was performed
25 against acetic acid-soluble shell matrices of BRD-affected shells (batches 2 and 3) and of non-
26 BRD-affected shells. For Western blot, the same extracts were tested. In addition, we
27 extracted further shell materials by incubating the acetic acid-insoluble fraction (of non-BRD-
28 affected shells, and of repaired patches, batch 1-3) in Laemmli buffer, 10 min. at 100°C.
29 These extracts are referred to as IM 1, IM 2, IM 3 in the text. Finally, Laemmli extracts of
30 brown ring were tested on Western blots. The extremely low quantity of acetic acid-soluble
31 matrix extracted from batch 1 precluded further comparison of this matrix.

32 For the ELISA comparisons, standard tests were performed as described above (cf.
33 Bulk analyses on shell matrices). For Western-blots, SDS-PAGE gels were blotted onto
34 PVDF Immobilon-P membrane (Millipore) with the Mini-Trans Blot module (Bio-Rad) for

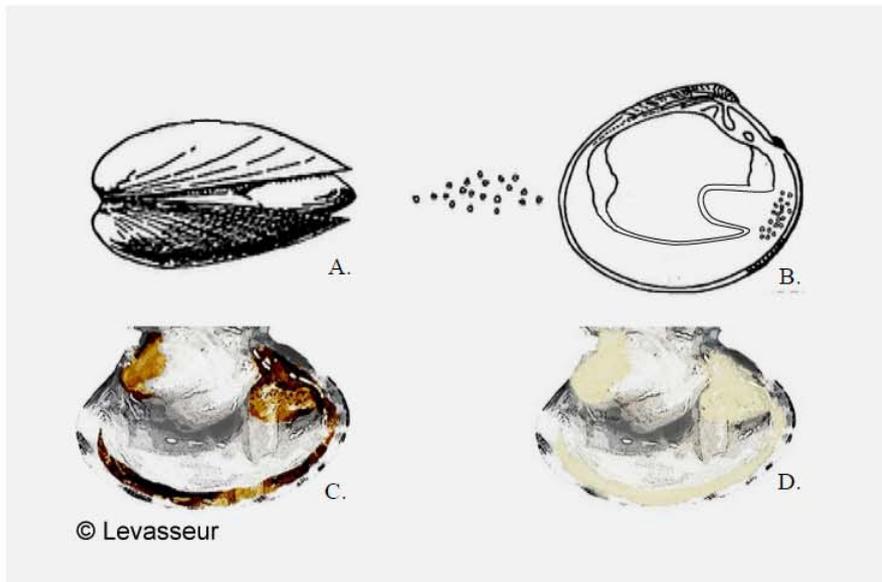
1 90 min at 120 mA (Towbin *et al.* 1979). Each blot was blocked with 1% gelatin in Tris-
 2 buffered-saline (TBS) for 30 min and incubated for 90 min with one of the polyclonal
 3 antibodies raised against the different shell fractions, at dilutions varying from 1/500 to
 4 1/16000. After washing with TBS/Tween 20, the membranes were incubated 90 min. with a
 5 diluted (1/6000) polyclonal goat anti-guinea-pig antibody (abcam, ref. ab6909), conjugated
 6 with alkaline phosphatase. After extensive washing, the membranes were incubated with the
 7 chemoluminescent substrate solution CDP Star (Sigma, C0712) for a few minutes and then
 8 briefly exposed to X-OMAT film (Kodak), which was subsequently developed.

9

10 **Results**

11 *Macroscopic and microstructural observations*

12 As shown in Fig. 1, the Brown Ring disease is characterized by the formation of a
 13 leathery organic ring-like layer in the inner surface of the shell. As observed in an earlier
 14 study (Paillard and Maes 1995a, b), the brown ring is made of a periostracal-like layer
 15 secreted by the clams, for covering the bacteria. The specimens, which overcome the
 16 infection, are characterized by new repair mineralization, which covers the brown ring. The
 17 extent of this mineralized layer is variable.

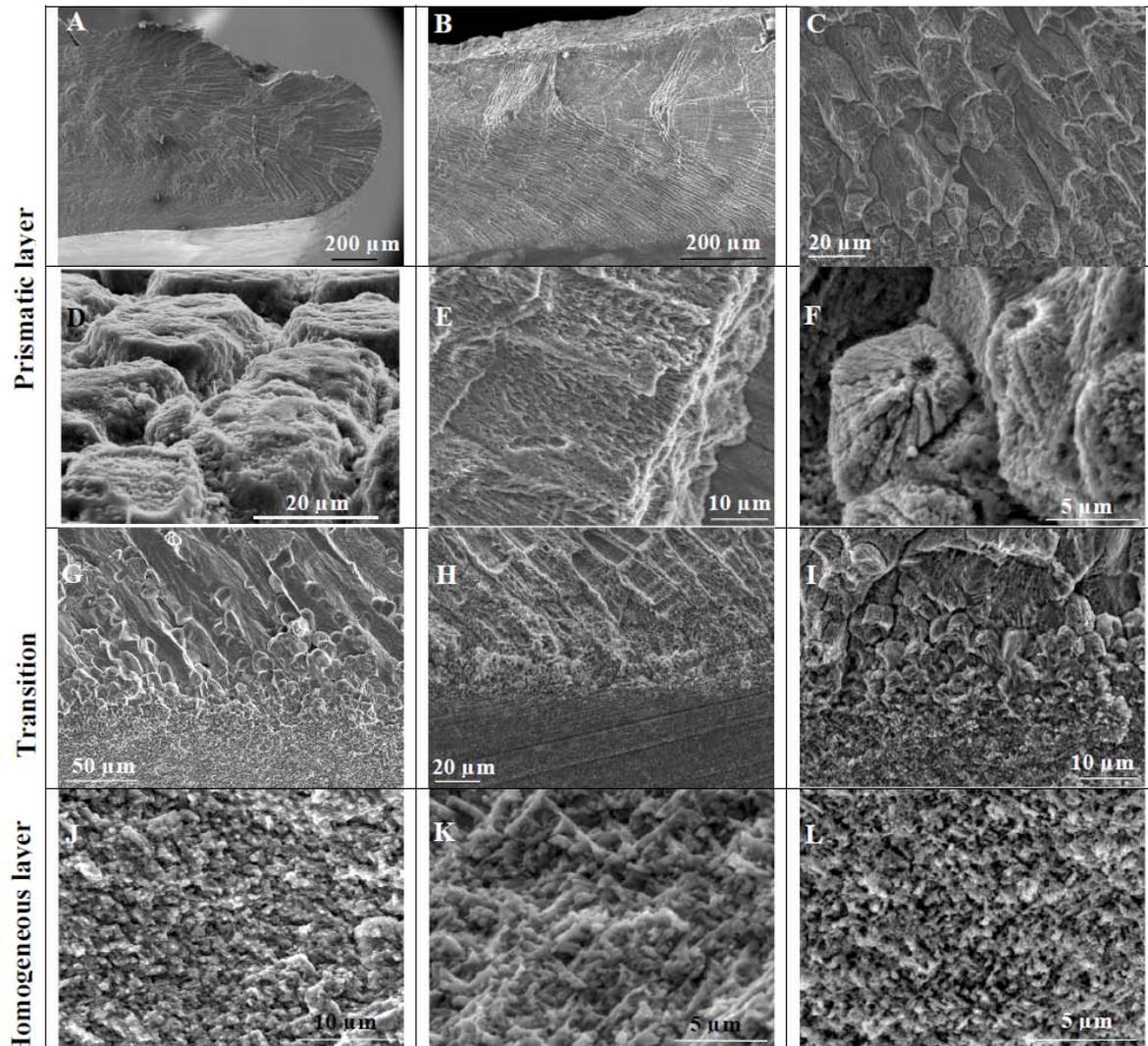


18

19 Figure 1: Sequences of events of the Brown Ring Disease in the Manila clam *Ruditapes*
 20 *philippinarum*. A. Penetration of the *Vibrio tapetis* between the valves of the Manila clam
 21 toward the pallial cavity, B. Colonization of *V. tapetis* on the inner layer of the clam at the
 22 level of the periostracal lamina; view of a empty animal, C. apparition of the brown deposit

1 on the affected zone; view of a empty animal, D. the total shell repair of a clam, view of a
2 empty animal.

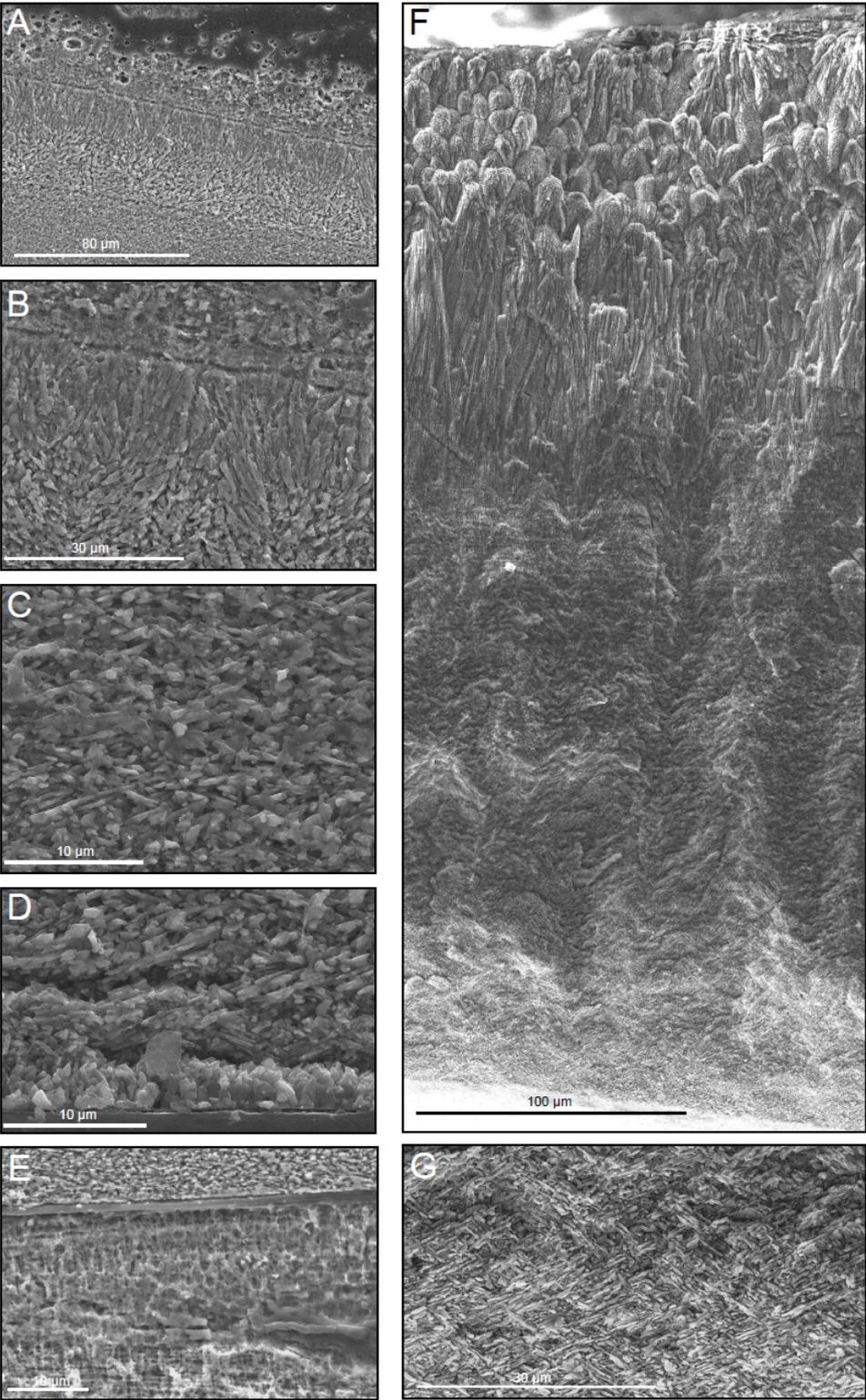
3 The shell of *Ruditapes philippinarum* is fully aragonitic. It is constituted of two layers,
4 the characteristics of which were successively described by Boggild (1930), Taylor *et al.*
5 (1973), Shimamoto (1986) and Popov (1992). The outer layer (600-700 μm thick) is
6 composite prismatic, while the internal layer, which constitutes the main layer (thickness > 1
7 mm), is homogeneous (Fig. 2A). In radial sections, the outer layer is constituted of bundles of
8 prisms (15-20 micron diameter) which develop parallel to the inner and outer borders of the
9 shell, and which diverge in a fan-like manner (Fig. 2A, B) towards the shell border. Growth
10 lines, which are clearly visible after a short etching with dilute acetic acid, are convex towards
11 the shell ventral margin (Fig. 2B). As underlined by Shimamoto (1986), 'individual prisms
12 are composed of minute acicular crystals (0.3 μm width) arranged in a feathery manner in
13 radial and tangential sections' (see Fig. 2C). According to (Uozumi and Suzuki 1981),
14 composite prisms are formed from the elongation of spherulites (Fig. 2F). The transverse
15 sections of the prisms are approximately square to pentagonal (Fig. 2C-E). The transition to
16 the underneath homogeneous layer is rather abrupt (Fig. 2G, H). At low magnification, the
17 homogeneous layer appears uniform. It is marked by a change in the geometry of the growth
18 surfaces (Fig. 2H), which are oblique (15°) to the contact plan between the two layers.
19 However, at higher magnification, the interface of the two layers seems to be made of
20 spherulites, which fuse, coalesce (Fig. 2I) and are progressively replaced by aggregates of
21 granular crystals, the size of which varies between 1 and 3 μm with a predominant size about
22 2 μm (Fig. 2J, K). Their aspect suggests that they are coated with an organic matrix. This
23 'granular' texture constitutes the main part of the homogeneous layer, which is however not
24 completely uniform: sub-layers can be distinguished, where granular crystals tend to orientate
25 preferentially according to two oblique directions (Fig. 2K, L). The maximal microstructural
26 variation occurs when acicular crystals substitute for the granules. The acicular crystals are
27 arranged in 'chevron' patterns. This peculiar microstructure is reminiscent of a fine crossed-
28 lamellar microstructure. It can be defined as 'crossed acicular' or 'fine complex crossed-
29 lamellar' (Carter 1980). The transition between granular and acicular crystals is gradual. The
30 innermost part of the homogeneous layer is constituted of a 3-4 μm thick glossy layer.



1 Figure 2: shell microstructure of a non-BRD-affected specimen. A: Tip of the shell, fresh
 2 fracture, radial section; the upper layer is made of bundles of composite prismatic structures,
 3 which diverge in a fan-like manner. B: same as A, after few seconds etching with acetic acid
 4 1% (v/v). C: bundles of composite prisms after 2 min. etching with 1% EDTA (w/v). D:
 5 prisms ending, internal side. E: composite prisms, after 5 min etching with 1% EDTA. F:
 6 details of the prisms, after 2 min. etching with 1% EDTA. G: transition between the
 7 composite prismatic and the homogeneous layers, radial section. H: idem, after 5 min etching
 8 with acetic acid. The growth planes of the homogeneous layer are oblique (about 15°) to the
 9 interface between the two layers. I: idem, higher magnification. J: homogeneous layer, fresh
 10 fracture, no etching. Note the ‘granular’ aspect of the texture, and the fact that the grains seem
 11 coated with organic materials. K: homogeneous layer, after 2 min etching with EDTA. Here is
 12

1 illustrated the peculiar ‘crossed acicular’ texture observed from time to time in the
2 homogeneous layer. L: idem, after few seconds etching with acetic acid.

3 The microstructures of the repair layers (Fig. 3) were observed according to two
4 preparation modes: in polished EDTA-etched sections, or on fresh EDTA or acetic acid-
5 etched fractures. At low magnification, the microstructural differences between the repair and
6 the normal homogeneous layer are not conspicuous. They become more obvious at high
7 magnification or when etching is performed. In polished and EDTA-etched sections, the early
8 stage of shell repair is characterized by the development of Christmas tree patterns,
9 perpendicular to the layer (Fig. 3 A, B). These patterns may evoke spherulitic/composite
10 prismatic structures, with the major difference that they develop perpendicularly to the border
11 of the repair patch (Fig. 3F). Note that they are not always visible in other repair zones, where
12 they are replaced by a layered porous microstructure, which may be enriched in organic
13 components (Fig. 3E). In later repair stages, one can observe aggregates of acicular crystals (5
14 μm length, 1 μm or less in diameter), which form chevron patterns (Fig. 3C). The chevrons
15 develop parallel to the border of the repair layer, and form an obtuse angle ($>130^\circ$). The repair
16 process is sealed by a thin (4-5 μm thick) layer constituted of aggregates of granular crystals,
17 which develop perpendicularly to the inner surface (Fig. 3D). Figure 3F shows a complete
18 section of a fresh fracture of a repair layer. From top to bottom (early to late repair stages),
19 one observes spherulithic structures, which cover a thickness of 150 μm . They are gradually
20 replaced by a mixture of granular and acicular crystals, or acicular crystals alone, particularly
21 in the late repair stage (Fig. 3G). As a general rule, the acicular crystals, which form chevron
22 patterns, are predominant in the repair layer, while they are a minor component in the normal
23 homogeneous layer. In none of our observations did we notice the presence of a true
24 composite prismatic microstructure.



1
2 Figure 3: microstructures of repaired patches. A: top of the repair patch. As illustrated, the
3 patch is composed of different layers. B: detail of A. Note the Christmas tree pattern, which
4 may be due to the growth of spherulitic mounts. C: a mixture of granular and acicular

1 (chevron-forming) crystals. D: end of the repair patch. The chevron-like patterns are sealed by
 2 a thin layer of granular crystals. E: direct contact between the repair patch (bottom) and the
 3 homogeneous layer. F: complete transect of a repair layer, which illustrates the
 4 microstructural variability of the repair layer, top: beginning of repair, bottom: end of repair.
 5 G: a typical ‘crossed-acicular’ texture, a variation of the “homogeneous” microstructure,
 6 which is often observed at a late repair stage (see F, bottom).

7

8 *Shell matrix extraction and quantification*

9 The results of the matrix quantification is indicated in Table 1: in non-BRD-affected
 10 shells, the acetic acid-soluble shell matrix represents about 0.04 wt-%, while the insoluble
 11 fraction accounts for more than 0.3 wt-%. The insoluble/soluble ratio is consequently about 8-
 12 10, and the total amount of matrix (both insoluble and soluble) represents about 0.36 wt-%.
 13 These values are comparable with those published for heterodont bivalves such as *Mercenaria*
 14 *mercenaria* (Crenshaw 1972). Note that the percentage of insoluble matrix is significantly
 15 lower than that of nacro-prismatic pteriomorphid bivalves. For each of the three batches of
 16 repaired specimens, the total amount of organic matrices is consistently higher than for the
 17 non-BRD-affected shells, and ranges from 1.5 to more than 7% wt-%. These high amounts
 18 are only due to the insoluble fractions, the percentages of which are significantly higher than
 19 the one of non-BRD-affected shells. In the three batches, the soluble fractions represent
 20 extremely minor amounts of the total matrix. We observe furthermore a great disparity of
 21 values, from batch to batch, both for soluble and insoluble matrices of repaired zones. As a
 22 result, the insoluble/soluble ratio is about 75 for batch 3, 280 for batch 2 and above 2000 for
 23 batch 1.

		Powder weight (g)	Insoluble organic matrix (% w/w)	Soluble organic matrix (% w/w)	Total organic matrix (% w/w)	Ratio insoluble/soluble
Non-BRD-affected clams		20.02	0.33 ± 0.001	0.0341 ± 0.001	0.36	10
Repaired clams	1	2.03	7.18 ± 0.003	0.0032 ± 0.000	7.18	2255
	2	4.58	1.79 ± 0.003	0.0063 ± 0.001	1.80	285
	3	4.94	1.47 ± 0.005	0.0194 ± 0.001	1.49	76

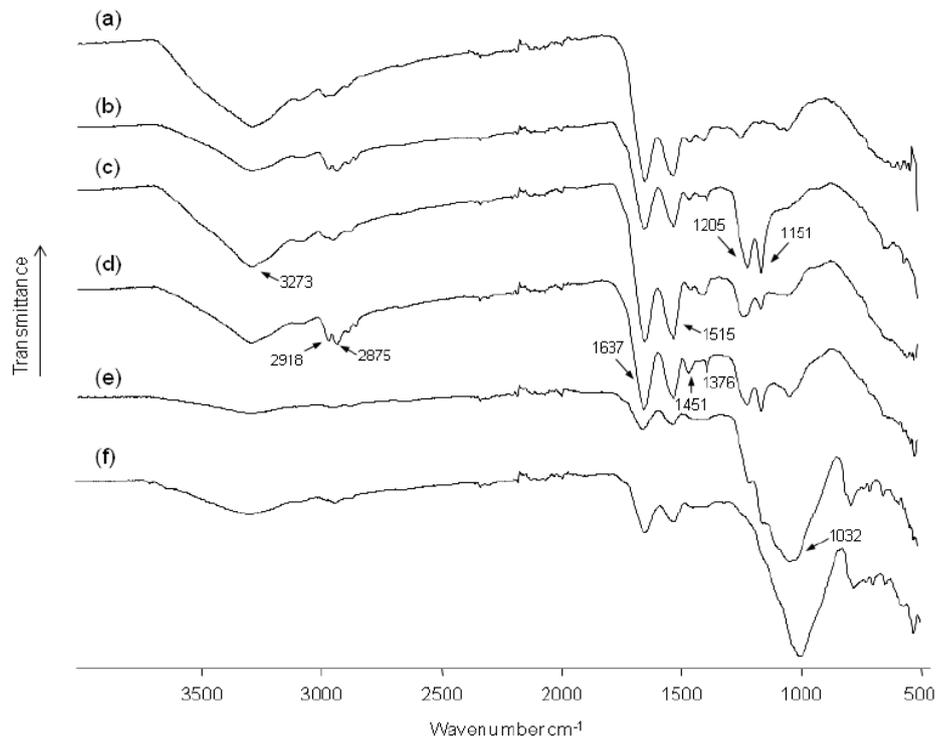
24

25 Table 1: Quantities of organic matrices (both acetic acid-soluble and acetic acid-insoluble)
 26 extracted from non-BRD-affected shell layers (homogeneous) and from repair patches,
 27 batches 1 to 3. The results are expressed in % of the shell powder weight.

28

1 *Bulk analyses on shell matrices: FTIR and ELISA*

2 The acetic acid-insoluble matrices of both non-BRD-affected and repaired zones, as
3 well as the brown ring, were compared by FTIR, and the results, expressed in percentage
4 transmittance *versus* wavelength, are shown on Fig. 4. The main peaks were identified
5 according to earlier work on shell matrices (Balmain et al. 1999; Dauphin and Marin 1995;
6 Marxen et al. 1998; Worms and Weiner 1986). All the spectra are characterized by the
7 presence of 'classical' bands for this type of matrix: amide A (3269 cm^{-1}), amide I ($1633-$
8 1646 cm^{-1}), amide II ($1514-1517\text{ cm}^{-1}$). In particular, the amide I peak corresponds to a main
9 protein absorption band. The insoluble 'repaired' matrices from batches 2 and 3, IMR2 and
10 IMR3, exhibit a broad peak at 1032 cm^{-1} (for IMR2) and 998 cm^{-1} (for IMR3). This region is
11 usually attributed to the absorption of sugar groups. In these two samples, this peak is much
12 more important than in the other samples, including IMR1. Additional peaks are observed in
13 the brown ring, in IMR1, and IMN samples: a series of peaks at $2963-2837\text{ cm}^{-1}$ that may
14 correspond to N-alkyl group, in correlation to those observed at 1450 and 1380 cm^{-1} ; one peak
15 at $1448-1452\text{ cm}^{-1}$, that is attributed to symmetric carboxylate group; one peak at $1234-1205$
16 cm^{-1} , that may correspond to sulfate groups. In IMR1 and IMN only a single sharp peak
17 ($1150-1151\text{ cm}^{-1}$) corresponds to C-O single bonding. The small peak at 626 cm^{-1} may
18 correspond to amide IV. From the spectral analysis, we observe that IMR2 and IMR3 are
19 almost superimposed on one hand, and that the brown ring (BR), IMN and IMR1 exhibit
20 several similarities on the other hand, IMN and IMR1 having the highest similarity in the
21 $1637-500\text{ cm}^{-1}$ region.



1

2 Figure 4: FTIR spectra measured from acetic acid insoluble matrices from brown ring (a),
 3 from non-BRD-affected shells: IMN1 (b), IMN3 (c), and from repaired patches: IMR1= batch
 4 1 (d); IMR2= batch 2 (e); IMR3 = batch 3 (f). The IMR1 spectrum is almost superimposed
 5 on that of IMN1 and 3, and all three differ significantly from IMR2 and IMR3 spectra.

6

7 The acetic acid-soluble matrices of both non-BRD-affected and repaired zones were
 8 serologically investigated by ELISA, which constitutes a quick, indirect and inexpensive
 9 method for comparing different complex soluble mixtures according to their cross-reactivity
 10 with a set of antibodies (Fautin and Lowenstein 1992). Thus, when tested with identical
 11 amounts of antigens - like in the present case - the technique gives indication of their overall
 12 serological similarity. In the present case (Table 2), we used a set of four antibodies raised
 13 against soluble matrices, which cross-react with the soluble matrix of non-BRD-affected
 14 clams. The test clearly shows that the soluble matrices extracted from the repaired zones are
 15 not similar to the one extracted from non-BRD-affected zone: the SMR1 shows a reactivity
 16 pattern, which is drastically different from that of the non-BRD-affected matrix (SMN): a
 17 high cross reactivity with anti-*Mercenaria* SM, low cross-reactivities with anti-*Pinctada*
 18 prisms and with anti-*Bathymodiolus*, and absence of reactivity with anti-P95 from *Unio*. The
 19 two other repaired matrices (SMR2 and SMR3) exhibit much higher reactivities with anti-P95
 from *Unio* than the non-BRD-affected matrix does. The cross-reactivity of SMR2 with the

1 anti-SM *Mercenaria* and the anti-SM *Bathymodiolus* is reduced. From the serological
 2 comparison, we conclude that SMR1 is the most different, and SMR3, the most similar to
 3 non-BRD-affected matrix, i.e., SMN.

	Non-BRD-affected soluble matrix	Repaired soluble matrix		
		Batch 1	Batch 2	Batch 3
SM- <i>Pinctada margaritifera</i> prisms	+++	+	+++	++
α -SM <i>Mercenaria mercenaria</i>	+++	++	++	+++
α -SM <i>Bathymodiolus sp.</i>	+++	+	+	++++
α -P95 <i>Unio pictorum</i>	+++	-	++++	++++

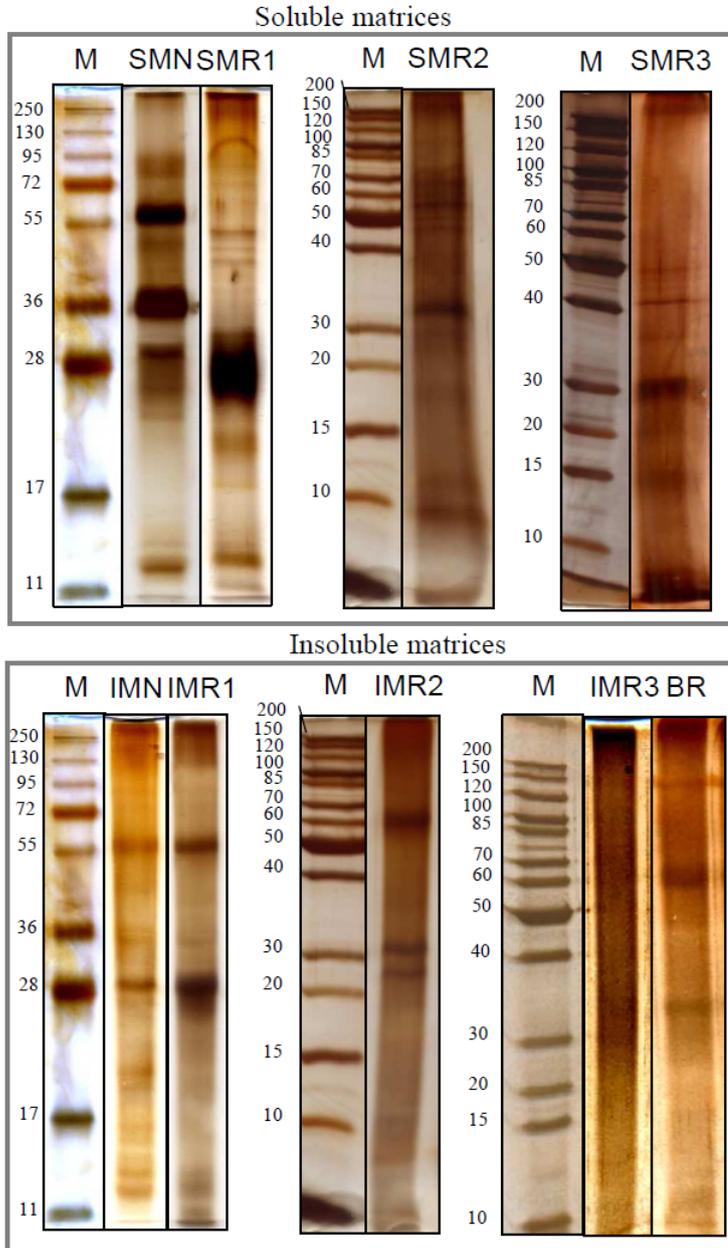
4
 5 Table 2: immunological reactivities of acetic acid-soluble matrices from non-BRD-affected
 6 and repaired layers against a set of four polyclonal antibodies. These antibodies were raised
 7 against shell matrices of diverse origins: pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) calcitic prism
 8 layer, American clam (*Mercenaria mercenaria*), deep-sea mussel (*Bathymodiolus sp.*),
 9 freshwater mussel (*Unio pictorum*). -: no cross-reactivity; +: 10-50% cross-reactivity; ++: 50-
 10 90% cross-reactivity; +++: 90-110% cross-reactivity; ++++: above 110% cross-reactivity. For
 11 each antibody, 100% represents the cross-reactivity obtained with the acetic acid-soluble
 12 matrix of non-BRD-affected specimens.

13
 14 *Soluble shell matrix analysis on SDS-PAGE*

15 On SDS-PAGE (Fig. 5), the shell matrix macromolecular components of non-BRD-
 16 affected specimens migrate as a few discrete bands and polydispersed macromolecules
 17 (smear), a pattern often observed with shell components. In the acetic acid-soluble matrix
 18 (SMN), prominent bands are observed at 12, 30, 35 and 58 kDa, in addition to a few more
 19 minor discrete components, dispersed between 12 and 100 kDa. In the acetic acid-insoluble
 20 fraction (of the non-BRD-affected samples, IMN), the same bands are observed but
 21 attenuated. In the three batches of repaired zones, the electrophoretic profiles of the soluble
 22 matrices are slightly to widely different: the first batch (SMR1) is characterized by the
 23 absence of the 35 and 58 kDa-bands, and by the presence of a thick 25 kDa component, not
 24 visible in its non-BRD-affected counterpart. In the two other soluble matrices (SMR2,
 25 SMR3), the 58 kDa band is absent and the 35 kDa band is attenuated. Both IMR2 and 3 are
 26 characterized by the abundance of polydispersed macromolecules. They exhibit similarities
 27 with IMR1 and IMN, in spite of the presence of an additional band at 25 kDa in IMR2. The

Chapitre 5

- 1 Brown Ring (BR) extract exhibits an electrophoretic pattern similar to that of IMN. In
- 2 addition, it exhibits a high molecular weight band around 150 kDa. From electrophoretic
- 3 patterns, and similarly to the ELISA results, we can conclude that SMR1 is the most different
- 4 matrix when compared to the non-BRD-affected soluble matrix (SMN).



- 5
- 6 Figure 5: SDS-PAGE of organic shell extracts from non-BRD-affected layers and from
- 7 repaired patches. M: molecular markers. SMN: acetic acid-soluble matrix of non-BRD-
- 8 affected layer. SMR1-3: acetic acid-soluble matrix of repaired layers, batches 1-3. IMN:
- 9 acetic acid insoluble/Laemmli-soluble matrix of non-BRD-affected layer. IMR1-3: acetic acid

1 insoluble/Laemmli-soluble matrix of repaired layers, batches 1-3. BR: Brown Ring extract.
2 The gels were stained with silver nitrate.

3 *Polyclonal antibodies against proteins of non-BRD-affected soluble matrix*

4 As shown in Fig. 6 (A), four protein fractions were obtained by using preparative
5 electrophoresis. The molecular weights of these fractions were respectively: 20, 25, 50 and 60
6 kDa. These fractions were used for eliciting polyclonal antibodies in guinea-pigs. These
7 antibodies were tested by ELISA and by Western-blotting, on acetic acid-soluble matrices
8 extracted from non-BRD-affected shells (SMH) and repaired patches (batch 2 and 3). On
9 Western-blot, we tested additionally the fractions, which were insoluble with acetic acid
10 (IM), but which could be further solubilized by Laemmli buffer, and Laemmli-soluble
11 extracts from the Brown Ring (Fig. 6).

12 On ELISA, the main observation is that, whatever the antibody used, the
13 immunological reactivity with acetic acid-soluble matrices from repaired patches (batches 2
14 and 3) is always far less than that obtained with the target antigens, i.e., the acetic acid-soluble
15 matrix of non-BRD-affected shells (SMN), when the same amount – 200 ng - of materials are
16 tested: this is particularly illustrated with the antibody FR08238 (Fig. 6D), for which the
17 cross-reactivity with SMR2 and SMR3 is only 10 and 20% respectively, of that of SMN. In
18 the best case (Fig. 6, A, histogram 6), the reactivity of SMR3 is 55% of that of the target
19 matrix. This suggests that the target antigen fractions of the four antibodies are less expressed
20 in the repair patches than they are in the non-BRD-affected homogeneous layer.

21 Western-blot gives similar results than ELISA, with, however, some noticeable
22 differences: the antibodies FR08234 and FR0823 (Fig. 6, A and B) exhibit a broader
23 reactivity since they also cross-react intensely with the four Laemmli extracts (IMN, IMR1,
24 IMR2 and IMR3). For these samples, a smear of polydisperse materials is visualized, in
25 addition to discrete bands (B, lanes 5 and 7). These two antibodies cross-react with the acetic
26 acid-soluble extracts of the two repaired batches by underlining a single thick band above 26
27 kDa, strongly marked in lane B6, but tenuous in lanes A4 or B4. On the other hand, the
28 antibodies FR08237 and FR08238, which appear far more specific, do not cross-react with
29 these extracts, neither with the Laemmli extracts of the repaired zones. With the exception of
30 FR08234, which gives a faint signal (see A, lane 8), none of the antibodies cross-reacts with
31 the Brown Ring extract.

32 We observed some discrepancies between the ELISA and the Western-blot data. For
33 example, in A, SMR2 cross-reacts in ELISA (A, histogram 4), but gives an extremely weak
34 signal on Western blot (A, lane 4). In C, the situation is analogous: cross-reactivity on ELISA,

Chapitre 5

1 and absence of cross-reactivity on Western blots. A possible explanation lies in the fact that
2 the matrices are not tested in the same conditions: they are in native state when tested by
3 ELISA, and denatured then tested on Western blots. The denaturation with Laemmli buffer
4 may disrupt some “structural” epitopes - composed of disulfide bridges for example - and
5 consequently modify their 3D-conformations.

6 Because the FR08237 and FR08238 antibodies cross react with non-BRD-affected
7 matrices but do not cross-react at all with repair matrices, they may be useful to localize
8 'negatively' the mantle cells responsible for the production of the repair patches, if mantle
9 cells – and not hemocytes – contribute predominantly to the repair process.

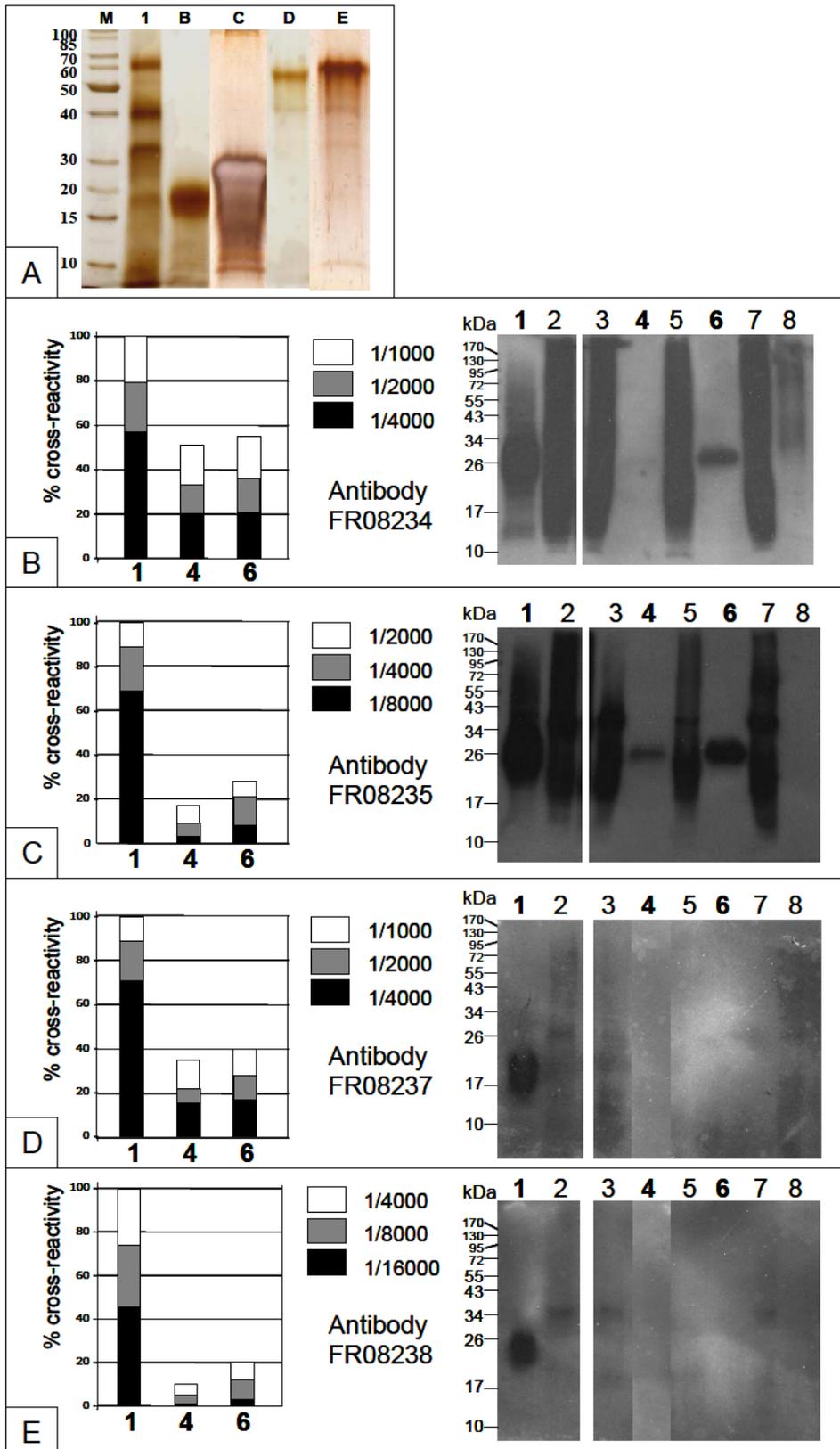


Figure 6: Comparison of immunological reactivities of four polyclonal antibodies, respectively FR08234 (B), FR08235 (C), FR08237 (D), and FR08238 (E) elicited against

1 electrophoretic fractions (A) of acetic acid-soluble extracts from non-BRD-affected shells
2 (inner homogeneous layer). FR08234 was elicited against fraction lane B, FR08235 against
3 fraction lane C, FR08237 against fraction lane D, and FR08238, against fraction lane E. The
4 immunological reactivities were measured by ELISA (left column, histograms) and visualized
5 by Western-blot (right column). 1: acetic acid-soluble matrix of non-BRD-affected shells,
6 SMN. 2: acetic acid-insoluble/Laemmli-soluble matrix of non-BRD-affected shells, IMN. 3:
7 acetic acid-insoluble/Laemmli-soluble matrix from repaired layer, batch 1, IMR1. 4: acetic
8 acid-soluble matrix of repaired layer, batch 2, SMR2. 5: acetic acid-insoluble/Laemmli-
9 soluble matrix of repaired layer, batch 2, IMR2. 6: acetic acid-soluble matrix of repaired
10 layer, batch 3, SMR3. 7: acetic acid-insoluble/Laemmli-soluble matrix of repaired layer,
11 batch 3. 8: Brown Ring extract (Laemmli-soluble). The acetic acid-soluble matrix of repaired
12 layer, batch 1 could not be tested, due to the extremely low amount of materials extracted (see
13 Table 1). For practical reasons, the acetic acid-insoluble/Laemmli-soluble extracts were not
14 tested by ELISA. For 1, 4 and 6, identical amounts of material were analyzed: 200 ng for
15 ELISA, and 10 µg for Western-blot.

16

17 **Discussion**

18 In molluscs, the formation of the shell is the result of a subtle interplay between the
19 mantle cells, the extracellular space and the mineral growth front. Abnormal calcifications,
20 such as shell repair, provide nice examples for investigating the process of mineralization *per*
21 *se*. Furthermore, it allows comparisons with the normal shell calcification regime. In this
22 paper, we have studied the shell repair process in the Japanese clam *Ruditapes philippinarum*
23 affected by the Brown Ring Disease. Although *R. philippinarum* is a bivalve of obvious
24 economical interest, it has been poorly investigated from a ‘biomineralization’ perspective.
25 Furthermore, the biochemical and microstructural aspects of its shell repair were previously
26 unknown. To our knowledge, ours is the first study that combines three levels of observations
27 - microstructural, biochemical and immunological – on that particular molluscan model, and
28 more generally, for the whole molluscan phylum.

29 In our study, we did not investigate the shell repair process at the cellular level, but
30 observed the finished product, once the repair was over. Thus, we did not identify which cells
31 were presumably responsible for the repair process. Some cellular aspects were addressed in a
32 parallel study (Trinkler *et al.* 2010). We indeed observed that hemocytes were present at
33 different stages of the shell repair, in the hemolymph, in the peripheral extrapallial fluid, and
34 in the central pallial fluid. These hemocytes were stained with Von Kossa, which strongly

1 suggested that they were transporting calcium salts, and that they were actively participating
2 to the repair process, as it had been suggested earlier for another bivalve species (Mount *et al.*
3 2004). The still unsolved question concerns the respective contribution of the hemocytes, on
4 one side, and of the mantle cells, on the other side, for the mineral deposition at the repair
5 patch. This question will need to be solved in subsequent studies.

6 The shell repair process of the clam corresponds to a particular type of repair, the
7 covering of harmful microorganisms, which colonize the periostracum and the inner side of
8 the shell, by a layer of mineralized tissues. Thus, geometrically, it appears as a ‘simple type’
9 shell repair, the secretion of a flat repair patch directly on flat tiny spots. This situation is
10 quite different from cases where mollusks have to repair artificially-created damage, like a
11 circular hole, made in their shell. In such examples, we evidenced that the geometry of the
12 calcifying mantle that retracts around the hole had a direct influence on the morphology of the
13 repair patch, which, in some cases, was flat, and in other cases, curved upwards and
14 associated with peculiar spherulitic microstructures (Fleury *et al.* 2008). In the present case,
15 by pre-supposing that the mantle cells contribute (together with hemocytes) to the repair
16 process, it is likely that the mantle geometry has little – if no - effect, since the mantle tissues
17 are apposed more or less parallel to the shell inner surface.

18 Although the geometry of the patch appears simple, it does not mean that the formed
19 microstructures and the secretory regime of the cells responsible for the repair are simple. In
20 our study, we compared the results obtained on three batches of repaired shells with those
21 obtained on non-BRD-affected shells. From a microstructural viewpoint, the repair patches
22 exhibit microstructures, which partly differ from the one of the homogeneous internal layer,
23 the main difference being the abundance of crossed-acicular crystals forming chevrons in the
24 repair zones, and the formation of Christmas tree structures perpendicularly to the inner shell
25 surface. From a biochemical viewpoint (matrix quantification, FTIR and SDS-PAGE) the
26 repair matrices are different, to diverse degrees, from the non-BRD-affected one. At last, from
27 serological comparisons, we observe that the matrices of the repair zones partially cross-react,
28 or do not cross-react at all, depending of the antibody used. One observation made from both
29 biochemical and immunological data is that the matrices of the repair zones exhibit certain
30 heterogeneity, from batch to batch. We can tentatively correlate this variability to the season
31 of sampling, batch 1 having been sampled in winter, batch 2, in spring and batch 3 in summer.

32 Our data allow underlining two conclusions: firstly, there is a drastic change of the
33 secretory regime of the cells – mantle or hemocytes - involved in the repair process, in
34 comparison to the normal shell formation process. This change operates at two levels. It is

1 primarily qualitative: some soluble proteins that are present in the acetic acid-soluble matrix
2 of non-BRD-affected shells are not expressed in the counterpart matrix of repair zone (in
3 particular, batch 1 on gel, or immunology with FR08237/FR08238 antibodies). Conversely,
4 some macromolecules, which are not expressed in a normal situation, may be expressed
5 during the shell repair process, as the electrophoretic profile of batch 1 suggests. The change
6 is also quantitative: in all repair batches, we detected a higher amount of acetic acid-insoluble
7 matrix than in the non-BRD-affected shells. This last point strongly suggests that the matrix
8 of the repair zone is submitted to extensive cross-linking, which renders it particularly
9 insoluble. This cross-linking would occur in particular via a quinone-tanning process (Waite
10 1983), involving phenoloxidases (Cong et al. 2005; Nagai et al. 2007).

11 The second conclusion is that the shell repair process is not a steady state, but knows
12 some temporal and specimen-to-specimen variations, which are directly translated in the
13 different microstructures found in the repair patch, as well as in the biochemical properties of
14 the associated matrices. This variability is most likely correlated to the irregular functioning
15 of the cells responsible for the repair process, when confronted with an abnormal situation,
16 such as shell repair, and to the susceptibility of each specimen to shell colonization by micro-
17 organisms.

18 The temporal variations of the secretory regime are informative with respect to the
19 plasticity of the molluscan shell microstructures. As shown in one of our illustration (Fig. 3F),
20 there is a gradual change from the beginning of the repair process to its end: elongated
21 ‘spherulitic-like’ microstructures, homogeneous (granular) to crossed-acicular, the latter being
22 reminiscent of crossed-lamellar microstructures. These subtle transitions suggest that the
23 switch from one type of microstructure to another type in heterodont bivalves such as
24 *Ruditapes*, may not require important changes in the secretory repertoire that control shell
25 microstructures. In other words, the synthesis (or the absence of synthesis) of a limited
26 number of key-macromolecules in the matrix mixture during the process of calcification may
27 induce important changes in the resulting microstructure. This idea needs obviously to be
28 tested further.

29 To conclude, this study throws a first glimpse on the subtleties of the secretory
30 repertoire synthesized during abnormal shell calcification. Our data suggest that some
31 macromolecular components (proteins or polysaccharides) are differentially expressed in the
32 cells responsible for the patch deposition and in the ones responsible for the normal shell
33 layer deposition. Among the putative tracks to follow for testing this idea is the possibility to
34 identify the mantle cells or/and hemocytes responsible for the deposition of the repair layer,

Chapitre 5

1 by using histological staining with some of our antibodies (the ones that do not cross-react
2 with the shell matrices of repaired layers). In parallel, can be tested at the protein or RNA
3 level the hypothesis of a higher expression of phenoloxidase in the cells responsible for the
4 deposition of the repair patch. At last, we can envisage a proteomic approach to obtain and
5 compare peptidic maps of non-BRD-affected shells and repair patches.

6

7 **Acknowledgments.** F. Marin and N. Guichard are supported by a grant (ANR BLAN06-
8 2_159971, ACCRO-Earth, coordinator G. Ramstein) for the period 2007-2010. We would
9 like to thank Susan Ford for manuscript corrections, Monique Briand for the figures and the
10 ARN multistress, the convention 7MAB and the “Région Bretagne” direction of the higher
11 education, of innovation and of research for financing.

1 **Literature cited**

- 2 Balmain, J., B. Hamoyer and E. Lopez. 1999. Fourier Transform Infrared Spectroscopy
3 (FTIR) and X-ray diffraction analyses of mineral and organic matrix during heating of mother
4 of pearl (Nacre) from the shell of the mollusk *Pinctada maxima*. J. Biomed. Mater. Res. 48:
5 749-754.
- 6 Carter, J.G. 1980. Guide to bivalve shell microstructures. pp. 645-673 in D.C. Rhoads and
7 R.A. Lutz, eds. Skeletal growth of aquatic organisms. Plenum Press, New York.
- 8 Caseiro, J., and J.P. Gauthier. 1997. L'huître aux lèvres noires, *Pinctada margaritifera*. I.
9 Dommages causés sur le bord des valves - Reconstruction - Evaluation des paramètres de
10 croissance de la nacre coquillière. Revue de Gemmologie A.F.G. 130: 7-13.
- 11 Caseiro, J., and J.P. Gauthier. 1998. L'huître aux lèvres noires, *Pinctada margaritifera*. II.
12 Altération créée par perçage central de la valve - Comparaison avec les altérations naturelles.
13 Revue de Gemmologie A.F.G. 133: 12-16.
- 14 Checa, A.G., and A.B. Rodriguez-navarro. 2005. Self-organization of nacre in the shells of
15 *Perioida* (Bivalvia: Mollusca). Biomater. 26: 1071-1079.
- 16 Clark, M.F., and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-
17 Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
- 18 Cong, R., W. Sun, G. Liu, T. Fan, X. Meng, L. Yang and L. Zhu. 2005. Purification and
19 characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. Fish Shellfish
20 Immunol. 18: 61-70.
- 21 Crenshaw, M.A. 1972. The soluble matrix of *Mercenaria mercenaria* shell. Biomineral. Res.
22 Rep. 6: 6-11.
- 23 Dauphin, Y., and F. Marin. 1995. The compositional analysis of recent cephalopod shell
24 carbohydrates by Fourier transform infrared spectrometry and high performance anion
25 exchange- pulsed amperometric detection. Experientia 51: 278-283.
- 26 Fautin, D.G., and J.M. Lowenstein. 1992. Scyphomedusae and their polyps are the same
27 immunologically: implications for systematics. Comp. Biochem. Physiol. B 102: 13-14.
- 28 Flassch, J.P., J. Barret, J. Mazurie, P. Maes, J.L. Nicolas, T. Noel, C. Paillard and M. Le
29 Pennec. 1992. L'élevage de la palourde, programme national de recherche sur la maladie de
30 l'anneau brun. pp. 127-140. Les mollusques marins, Biologie et aquaculture, Conference
31 proceedings. Ifremer, Brest.
- 32 Fleury, C., F. Marin, B. Marie, G. Luquet, J. Thomas, C. Josse, A. Serpentine and J.M. Lebel.
33 2008. Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata*: A histological and
34 microstructural study. Tissue & Cell 40: 207-218.

- 1 Flye Sainte Marie, J., P. Soudant, C. Lambert, N. Le Goïc, M. Goncalvez, M.A. Travers, C.
2 Paillard and F. Jean. 2009. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes*
3 *philippinarum* in the field during an annual cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 377: 1-11.
- 4 Huchette, S., C. Paillard, J. Clavier and R. Day. 2006. Shell disease: abnormal conchiolin
5 deposit in the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Org.* 68: 267-271.
- 6 Kapur, S.P., and A. Sen Gupta. 1970. The role of amoebocytes in the regeneration of shell in
7 the land pulmonate, *Euplecta indica* (Pfeffer). *Biol. Bull.* 139: 502-509.
- 8 Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of
9 Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 10 Marie, B., G. Luquet, L. Bédouet, C. Milet, N. Guichard, D. Medakovic and F. Marin. 2008.
11 Nacre calcification in the freshwater mussel *Unio pictorum*: carbonic anhydrase activity and
12 purification of a 95-kDa calcium-binding glycoprotein. *ChemBioChem.* 9: 2515-2523.
- 13 Marin, F. 2003. Molluscan shell matrix characterization by preparative SDS-PAGE. *Scientific*
14 *World Journal* 3: 342-347.
- 15 Marin, F., G. Luquet, B. Marie and D. Medakovic. 2008. Molluscan shell proteins: primary
16 structure, origin, and evolution. *Current topics in developmental biology* 80: 209-276.
- 17 Marin, F., G. Muyzer and Y. Dauphin. 1994. Caractérisation électrophorétique et
18 immunologique des matrices organiques solubles de deux Bivalves Ptériomorphes actuels,
19 *Pinna nobilis* (L.) et *Pinctada margaritifera* (L.). *C. R. Acad. Sci. Paris* 318: 1653-1659.
- 20 Marin, F., L. Pereira and P. Westbroek. 2001. Large-scale fractionation of molluscan shell
21 matrix. *Protein Expr. Purif.* 23: 175-179.
- 22 Marshall, D.J., and R. Day. 2001. Change in the rate of shell deposition and shell
23 microstructure in response to shell borers in the abalone *Haliotis rubra*. *mar. Freshw. Behav.*
24 *Physiol.* 34: 189-195.
- 25 Marxen, J.C., M. Hammer, T. Gehrke and W. Becker. 1998. Carbohydrates of the organic
26 matrix and the shell-forming tissues of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say). *Biol. Bull.* 194:
27 231-240.
- 28 Morrissey, J.H. 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure
29 with enhanced sensitivity. *Anal. Biochem.* 117: 307-310.
- 30 Mount, A.S., A.P. Wheeler, R.P. Paradkar and D. Snider. 2004. Hemocyte-mediated shell
31 mineralization in the eastern oyster. *SCIENCE* 304: 297-300.
- 32 Muyzer, G. 1988. *Immunological Approaches in Geological Research.* p. 107. University of
33 Leiden, Leiden.

- 1 Nagai, K., M. Yano, K. Morimoto and H. Miyamoto. 2007. Tyrosinase localization in mollusc
2 shells. *Comp. Biochem. Physiol. B* 146: 207-214.
- 3 Nollens, H.H., J.C. Schofield, J.A. Keogh and P.K. Probert. 2002. Evaluation of radiography,
4 ultrasonography and endoscopy for detection of shell lesions in live abalone *Haliotis iris*
5 (Mollusca: Gasteropoda). *Dis. Aquat. Org.* 50: 145-152.
- 6 Paillard, C. 2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes*
7 *philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Living Resour.* 17: 467-475.
- 8 Paillard, C., and P. Maes. 1990. Etiology of the brown ring disease in *Tapes philippinarum*:
9 pathogenicity of a *Vibrio sp.* *C. R. Acad. Sci. Paris* 310: 15-20.
- 10 Paillard, C., and P. Maes. 1995a. The brown ring disease in the Manila Clam, *Ruditapes*
11 *philippinarum* I Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *J. Invertebr. Pathol.* 65:
12 91-100.
- 13 Paillard, C., and P. Maes. 1995b. The brown ring disease in the Manila Clam, *Ruditapes*
14 *philippinarum* II Microscopic study of the brown ring syndrome. *J. Invertebr. Pathol.* 65: 101-
15 110.
- 16 Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from
17 polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl.*
18 *Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- 19 Trinkler, N., J.F. Bardeau, F. Marin, M. Labonne, A. Jolivet and C. Paillard. 2010. The
20 mineral phase in the shell repair in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affected by the
21 Brown Ring Disease: a Raman micro-spectrometry, SEM and hemocyte cellular study. *Dis*
22 *Aquat. Org.*, submitted.
- 23 Trinkler, N., M. Labonne, F. Marin, A. Jolivet, M. Bohn, C. Poulain, J.F. Bardeau and C.
24 Paillard. 2009a. *Ruditapes philippinarum* shell repair face front to the Brown Ring Disease: a
25 follow-up of the organic matrix using Raman spectroscopy and WDS microprobe *Anal.*
26 *Bioanal. Chem.* In Press.
- 27 Trinkler, N., F. Marin, N. Guichard, M. Labonne, J.F. Bardeau and C. Paillard. 2009b. Shell
28 repair in the clam *Ruditapes philippinarum*, affected by the Brown Ring Disease (BRD): a
29 biochemical and serological study. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 1187: 89-94.
- 30 Trinkler, N., G. Siquin, J. Querne and C. Paillard. 2009c. Resistance to Brown Ring Disease
31 in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: A study of selected stocks showing a recovery
32 process by shell repair. *J. Invertebr. Pathol.* In Press.
- 33 Uozumi, S., and S. Suzuki. 1981. The evolution of shell structures in the Bivalvia. Study of
34 molluscan paleobiology. *Prof. M. Omori Memorial Volume*, pp.63-77.

Chapitre 5

- 1 Waite, J.H. 1983. Quinone-tanned scleroproteins. pp. 467-504 in K.M. Wilbur, ed. *The*
- 2 *mollusca*. Academic Press, New York.
- 3 Worms, D., and S. Weiner. 1986. Mollusk shell organic matrix: Fourier Transform Infrared
- 4 study of the acidic macromolecules. *J. Exp. Zool.* 237: 11-20.
- 5
- 6

Shell repair in the clam *Ruditapes philippinarum*, affected by the Brown Ring Disease (BRD): a biochemical and serological study

Nolwenn Trinkler¹, Frédéric Marin², Nathalie Guichard², Maylis Labonne¹, Jean –François Bardeau³ and Christine Paillard¹

¹ IUEM, UMR CNRS 6539, Technopole Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

² Laboratoire de Biogéosciences, UMR 5561, Université de Bourgogne, 6 bd Gabriel, 21000 Dijon, France.

³ LPEC, UMR CNRS 6087, Université du Maine, 72085 Le Mans Cedex 9.

ABSTRACT

For more than two decades, the edible clam *Ruditapes philippinarum* has been affected by the Brown Ring Disease (BRD), a bacterial infection characterized by the formation of a brown organic deposit in the internal side of the valves. Although this infection is often lethal, in some cases specimens can overcome it by remineralizing the shell over the organic deposit. The goal of the present study is to compare biochemically and immunologically the shell matrices of repaired and healthy zones. Our data suggest that the repair zones exhibit certain variability, which would be the direct consequence of a modification of the secretory regime of calcifying tissues responsible of the repair process.

INTRODUCTION

In 1987, mass mortalities affected the cultured manila clam *Ruditapes philippinarum*, in particular in Landeda (North Finistère, Brittany), the first production site in France (with a production of 500 tons of Manila clams at that time) [1, 2]. In 1989, Paillard and Maes showed that mortalities were correlated with the presence of a brown deposit on the inner surface of the valves. This disease, named Brown Ring Disease (BRD) was found to be caused by a bacterium *Vibrio tapetis* [1].

Vibrio tapetis colonizes the periostracum and inhibits the normal process of shell biomineralization. The response of the clam to the bacterium attack consists in the production and accumulation of a brown organic matrix on the inner and peripheral surface of the shell, in contact with the mantle tissues. When the hemolymph and the soft tissues are colonized, the clam rapidly dies. However, in some cases, clams overcome the infection by secreting a mineralized white layer, which covers and fully isolates the brown organic deposit [3, 4].

This study focuses on the shell repair process. Previous physical investigations on repaired specimens with scanning electron microscopy, Raman spectrometry and Wave-length Dispersive Spectrometry microprobe have shown the quantitative importance of the organic matrix before and during the recovery process: first, the brown deposit is almost totally organic. Then, in the mineralized repaired zone, the level of organic matrix remains high [5].

The aim of this study is to characterize and compare the organic matrix extracted from healthy and repaired zones in the shell of the Manila clam, in order to understand the repair process. To this end, three batches of repaired specimens were selected. The different shell matrices were extracted, quantified, and qualitatively compared on 1D electrophoresis.

Serological ELISA comparisons were also performed with a set of different polyclonal antibodies raised against soluble matrices or against isolated shell fractions. Our approach is a preliminary step for accurately selecting resistant clam populations, which fully repaired their damaged shells. On a longer term, these resistant populations may be grown and re-introduced in the former production sites, for giving a new boost to the clam economy in Brittany.

EXPERIMENTAL DETAILS

Diseased animals were collected in Landeda (North Finistère, Brittany, France) and healthy animals in the Morbihan gulf ("Ile aux Oiseaux", France). Animals were sacrificed and the soft tissues were separated from the shell, which were directly observed under binocular to check for the presence of the BRD and the repair zone. Shells were thoroughly cleaned with tap water. Some shells were observed with a Philips ESEM XL30 LaB6 Scanning Electron Microscope.

Healthy shells were scrupulously brushed and abraded to remove the outer layer. They were crushed in small fragments, and the fragments were soaked in dilute sodium hypochlorite (0.26% active chlorine) overnight to remove potential surface contaminants. They were thoroughly rinsed with water and dried, before being crushed under liquid nitrogen. For diseased shells, we used three different batches of diseased shells, which weighed 2.03 (February 2008), 4.58 (May 2008) and 4.94 g (July 2008) respectively. These three batches were treated similarly. To minimize any loss of materials, the repaired fragments were crushed manually in a mortar.

For all samples, the matrix extraction was performed by dissolving the powders in cold dilute acetic acid, overnight at 4°C. The soluble matrices were collected, centrifuged, concentrated by ultrafiltration, extensively dialyzed against water and freeze-dried. The insoluble pellets were thoroughly rinsed and also freeze-dried.

The shell matrices (healthy soluble, healthy and repaired insoluble) were quantified by weighing the lyophilized pellets on a precision balance. For the soluble matrices associated to repaired zones (batches 1-3), the amount was too low for direct weighing (< 500 µg). The matrix was then quantified by Bio-Rad DC protein assay in a microplate read at 750 nm. Known amounts of soluble matrix of healthy clams were used for constructing the calibration curve.

For the shell matrix analysis on SDS-PAGE, the soluble matrices were diluted with an equal volume of 2x Laemmli sample buffer (LSB) [6] containing β-mercaptoethanol, and heat denatured (100°C) for 5 min. Aliquots of the insoluble matrices were suspended in water to which an equal volume of LSB was added and heat denatured for 8 minutes. Only a part of the insoluble matrix further solubilized with this treatment. All matrices were run on 12% discontinuous mini polyacrylamide SDS-PAGE gels (Mini-Protean 3, Bio-Rad). The gels were directly stained with silver nitrate, according to Morrissey [7]. We also compared the electrophoretic profiles of our extracts, both insoluble and soluble, with Laemmli-soluble extracts from cleaned and decontaminated brown rings.

Serological comparisons between the healthy and the repaired acido-soluble matrices were performed according to standard ELISA [8]. Known amounts of soluble matrices were serially diluted (100 to 12.5 ng per well) in Nunc Maxisorp microplates. As first antibodies, we used a selection of polyclonal antibodies, elicited against different molluscan shell matrices which show cross reactivity with the healthy soluble matrix of *R. philippinarum*: anti-soluble matrix from *Pinctada margaritifera*, anti-soluble matrix from *Mercenaria mercenaria*, anti-soluble matrix

from *Bathymodiolus* sp. and anti-P95, a soluble protein of the shell of *Unio pictorum* [9-11]. Microplates were read at 405 nm, and the optical densities, translated in percentages of reactivity.

DISCUSSION

Shell microstructure of *Ruditapes philippinarum*

The shell of *Ruditapes philippinarum* is fully aragonitic. As shown in Fig. 1, it is composed of two layers: the outer one is composite prismatic (Fig. 1a). The inner one is homogeneous (Fig. 1b). In the repaired layer, one observes a microstructure, which is reminiscent of a finely crossed-lamellar-like texture (Fig. 1c).

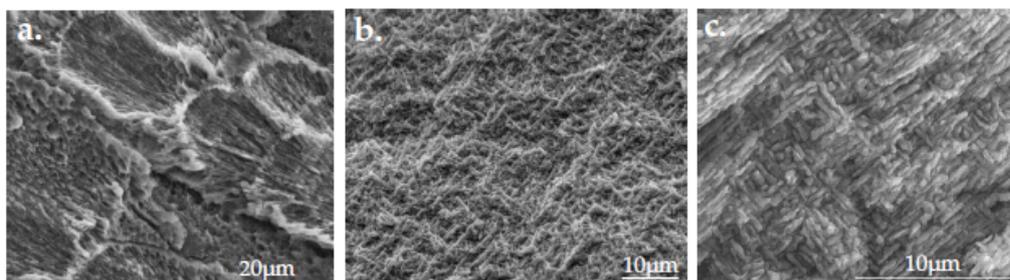


Figure 1: Shell microstructures of *Ruditapes philippinarum*. a. Healthy, outer layer: composite prismatic; b. Healthy, inner layer: homogenous; c. Microstructure at the repair zone.

Extraction and quantification of the organic matrices

In healthy shells, the acetic acid-soluble shell matrix represents about 0.04 wt-%, while the insoluble fraction accounts for almost 0.2 wt-%, which means an insoluble/soluble ratio about 5. These values are comparable with those published for heterodont bivalves such as *Mercenaria mercenaria* [12]. Note that the percentage of insoluble matrix is significantly lower than that of nacro-prismatic pteriomorphid bivalves. For each of the three batches of repaired specimens, the total amount of organic matrices is consistently higher than for the healthy shells, and ranges from 1.5 to more than 7% wt-%. In particular, the insoluble matrices are much more abundant while the corresponding soluble matrices represent an extremely minor fraction of the total matrix in the three cases. However, we observe a great disparity of the values, both for soluble and insoluble matrices of repaired zones. As a result, the insoluble/soluble ratio is about 75 for batch 3, 280 for batch 2 and above 2000 for batch 1.

Table 1. Percentages (% w/w) of organic matrices in healthy and repaired clams, means and standard deviations

	Insoluble organic matrix (% w/w)	Soluble organic matrix (% w/w)	Total organic matrix (% w/w)
Healthy	0.180 ± 0.106	0.0388 ± 0.0053	0.219 ± 0.103

clams				
Repaired	1	7.18 ± 0.003	0.0032	7.18
clams	2	1.80 ± 0.003	0.0063	1.81
	3	1.47 ± 0.004	0.0194	1.49
		± 2.62	± 0.00702	± 2.61

Mono-dimensional electrophoresis

On SDS-PAGE (Fig. 2), the shell matrices of healthy specimens are characterized by few discrete bands and polydisperse macromolecules (smear). In particular, in the soluble matrix (SMH), prominent bands are observed at 12, 30, 35 and 58 kDa, in addition to few more minor discrete components, dispersed between 12 and 100 kDa. In the insoluble fraction (IMH), the same bands are observed but attenuated. In the three batches of repaired zones, the electrophoretic profiles of the soluble matrices are different, in particular in the first batch (SMR1), which is characterized by the absence of the 35 and 58 kDa-bands, and by the presence of a thick 25 kDa component, not visible in its healthy counterpart. In the two other soluble matrices (SMR2, SMR3), the 58 kDa band is absent and the 35 kDa band is attenuated. Both IMR2 and 3 are characterized by the abundance of polydisperse macromolecules. They exhibit similarities with IMR1 and IMH, in spite of the presence of an additional band at 25 kDa in IMR2. The Brown Ring (BR) extract exhibits an electrophoretic pattern similar to the one of IMH. In addition, it exhibits a high molecular weight band around 150 kDa.

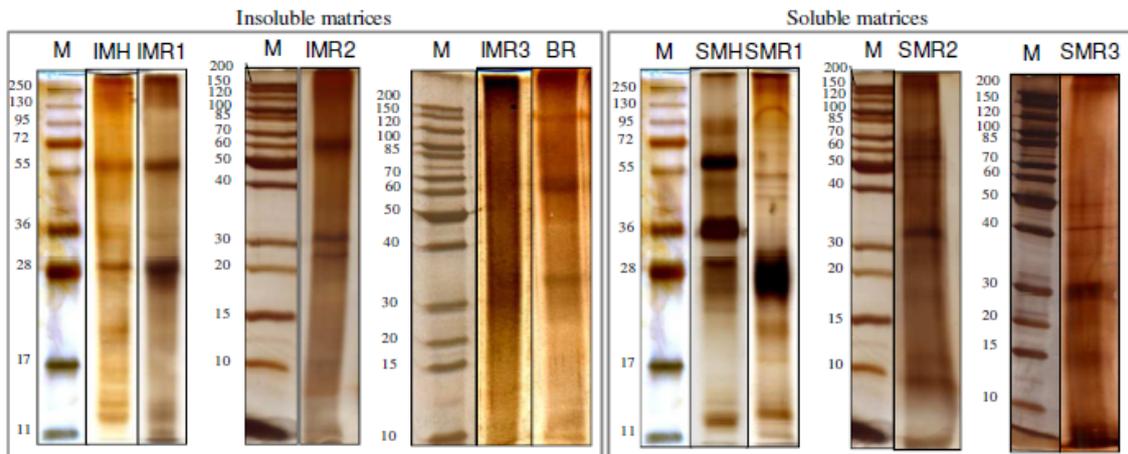


Figure 2. SDS-PAGE of the shell matrices from the inner layer of healthy shells and repaired layers, stained with silver nitrate. In addition, the Brown Ring matrix (BR) was also analyzed. IMH: insoluble matrix of healthy shells; SMH: soluble matrix of healthy shell; IMR1-3: insoluble matrix of repaired zone, batches 1 to 3; SMR1-3: soluble matrix from repaired zones, batches 1 to 3. M: molecular weight markers.

Elisa tests

ELISA constitutes a quick, indirect and inexpensive method for comparing different complex mixtures according to their cross-reactivity with a set of antibodies. Thus, when tested with identical amounts of antigens (like in the present case), it gives indication of their overall serological similarity. In the present case (Table 2), we used a set of four antibodies raised against soluble matrices, which cross-react with the soluble matrix of healthy clams. Similarly to SDS-PAGE, the test confirms that the soluble matrices extracted from the repaired zones are not similar to the one extracted from healthy zone: the SMR1 shows a reactivity pattern, which is drastically different from that of the healthy matrix (SMH): a high cross reactivity with anti-*Mercenaria* SM, low cross-reactivities with anti-*Pinctada* prisms and with anti-*Bathymodiolus*, and absence of reactivity with anti-P95 from *Unio*. The two other repaired matrices (SMR2 and SMR3) exhibit much higher reactivities with anti-P95 from *Unio* than the healthy matrix does. The cross-reactivity of SMR2 with the anti-SM *Mercenaria* and the anti-SM *Bathymodiolus* is reduced. The cross-reactivity pattern of SMR3 is the most similar to that of SMH.

Table 2. Elisa Tests of the soluble matrices from the healthy inner layer (SMH) and repaired layer (SMR1-3), α -SM: antibody raised against the soluble matrix of *Pinctada margaritifera* (prismatic layer only), of *Mercenaria mercenaria*, of *Bathymodiolus* sp.. In addition the preparation were tested against a more specific antibody raised against a 95 kDa-protein of *Unio pictorum*. -: no reactivity; +: 10-50% reactivity; ++: 50-90% reactivity; +++: 90-110% reactivity; ++++: 110-150% reactivity; +++++ above 150%. For each antibody, the cross reactivity with the soluble matrix extracted from healthy specimens represents 100% reactivity.

	SMH	SMR1	SMR2	SMR3
α -SM- <i>Pinctada margaritifera</i> prisms	+++	+	+++	++
α -SM <i>Mercenaria mercenaria</i>	+++	++	++	+++
α -SM <i>Bathymodiolus</i> sp.	+++	+	+	++++
α -P95 <i>Unio pictorum</i>	+++	-	+++++	+++++

CONCLUSIONS

In the present paper, we have compared the matrices extracted from repaired zones to that extracted from healthy specimens of the edible clam *Ruditapes philippinarum*. Our results, obtained with three different approaches, quantification, SDS-PAGE and ELISA, are complementary and consistent. In all cases, they emphasize certain variability of the shell matrix associated with the repair zones. Although some similar protein bands are visible in the healthy and in the repaired zones, important differences are observed. The most different matrix was observed in batch 1, and the most similar one, in batch 3. The observed differences are the direct consequences of a drastic modification in the secretory regime of the mantle cells responsible for mineral deposition, during the repair process. Similar observations have been recently made in the abalone *Haliotis tuberculata* [13].

This study is now being pursued, in order to find molecular markers, which characterize the shell recovery process in the clam *Ruditapes philippinarum*. To this end, we are developing a

proteomic approach that we combine with immunological investigations with antibodies raised against purified protein fractions extracted from the soluble matrix.

ACKNOWLEDGMENTS

The work of F. Marin and N. Guichard is financially supported by an ANR (ACCRO-EARTH, ref. BLAN06-2_159971, coordinator G. Ramstein, LSCE) during the period 2007-2010. N. Trinkler and F. Marin thank A. Bonnotte (CMAB, Dijon) for handling the ESEM.

REFERENCES

1. C. Paillard and P. Maes, *C. R. Acad. Sci. Paris* **310**, 3, 15 (1990).
2. J. P. Flassch and Y. Leborgne, "Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese manila clam (*Tapes philippinarum*) and effects on aquaculture production and natural settlement", *ICES Mar. Sci.*, **194**, 92 (1992).
3. C. Paillard and P. Maes, *J. Invertebr. pathol.* **65**, 91 (1995).
4. C. Paillard and P. Maes, *J. Invertebr. pathol.* **65**, 101 (1995).
5. N. Trinkler, M. Labonne, J.-F. Bardeau, F. Marin, A. Jolivet, M. Bohn, C. Poulain, C. Paillard, submitted to *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
6. U. K. Laemmli, *Nature* **227**, 680 (1970).
7. J. H. Morrissey, *Anal. Biochem.* **117**, 2, 307 (1981).
8. M. F. Clark and A. N. Adams, *J. Gen. Virol.* **34**, 475 (1977).
9. G. Muyzer, P. Westbroek and J. F. Wehmiller, *Hist. Biol.* **1**, 1 (1988).
10. F. Marin, G. Muyzer and Y. Dauphin, *C. R. Acad. Sci. Paris* **318**, 2, 1653 (1994).
11. B. Marie, G. Luquet, L. Bédouet, C. Milet, N. Guichard, D. Medakovic and F. Marin, *ChemBiochem.* **9**, 2515 (2008).
12. M. A. Crenshaw, *Biomim. Res. Rep.* **6**, 6 (1972).
13. C. Fleury, F. Marin, B. Marie, G. Luquet, J. Thomas, C. Josse, A. Serpentine, and J. M. Lebel, *Tissue Cell* **40**, 207 (2008).

Conclusion et perspectives

Le but de ce travail de thèse était de comprendre et caractériser comment certaines palourdes japonaises sont capables de résister à la Maladie de l'Anneau Brun, principalement en étudiant le mécanisme de réparation coquillière. Pour ce faire, ce travail a été fait à différentes échelles : populationnelle, individuelle, microstructurale, cellulaire, moléculaire et ionique. Les résultats de cette étude vont être utilisés dans un futur proche lors de la sélection de familles de palourdes japonaises résistantes à la MAB, afin de relancer de manière stable la vénériculture de cette espèce en Europe.

1. Les mécanismes de résistance de la palourde face à la Maladie de l'Anneau Brun

Le premier objectif de cette thèse était de caractériser par quels mécanismes de défense, la palourde japonaise peut résister à la MAB causée par la bactérie *Vibrio tapetis*. Pour ce faire, deux stocks de palourdes : un sensible et un moins sensible, ont été suivis sur 3 générations (Article 1). Ces stocks provenaient d'une ferme aquacole : la SATMAR, dont une des grandes activités est la production de naissains et la conchyliculture des palourdes. Aussi bien en laboratoire que dans le milieu naturel, les résultats de ce suivi ont permis de mettre en évidence qu'il existait deux moyens de résister à la MAB. Certaines palourdes ne présentaient aucun symptôme de la maladie et d'autres, plus nombreuses, étaient capables de guérir après avoir recouvert totalement le dépôt brun par une couche coquillière de réparation. Ces 2 types de palourdes résistantes ont été observés en plus forte proportion dans le lot le moins sensible que dans le lot le plus sensible au cours des 3 générations. Ces phénotypes pourraient donc être héréditaires.

La palourde japonaise est un bivalve économiquement très important. Or depuis une vingtaine d'années, il n'est presque plus possible de les élever, notamment dans le Finistère nord. C'est dans ce contexte que certains acteurs professionnels comme la SATMAR se sont investis dans la production de stocks de palourdes avec des degrés de résistance différents. Ce sont ces stocks qui ont été étudiés dans l'article 1. Les résultats de l'ensemble des travaux de cette thèse vont permettre de sélectionner des géniteurs avec comme marqueur de sélection principal la réparation coquillière, et de tenter de produire de véritables familles résistantes à la MAB dans le but de relancer de manière stable la vénériculture de la palourde japonaise. C'est le principal sujet de thèse de Fanny Jeffroy financée par une bourse CIFRE (SATMAR)

et par un programme Région Bretagne Innovation. C'est dans ce contexte que la résistance de la palourde japonaise face à la MAB et sa potentielle héritabilité va être étudiée à un niveau génétique.

Comme la réparation coquillière est le mécanisme de résistance à la MAB le plus fréquemment observé, ce phénomène a été étudié en détail dans la suite de cette thèse. Des outils analytiques comme des Microscopes Electroniques à Balayage (MEB), un microspectromètre confocal Raman, une microsonde WDS, ainsi que des colorations cellulaires, la biochimie et la sérologie ont été utilisées.

2. Les palourdes japonaises non symptomatiques

Afin de bien comprendre le processus de réparation coquillière, il a été nécessaire d'étudier en amont les palourdes non symptomatiques et notamment leur coquille (Article 1-5). Certains résultats sont nouveaux et d'autres ont permis de confirmer des travaux antérieurs (figure 1).

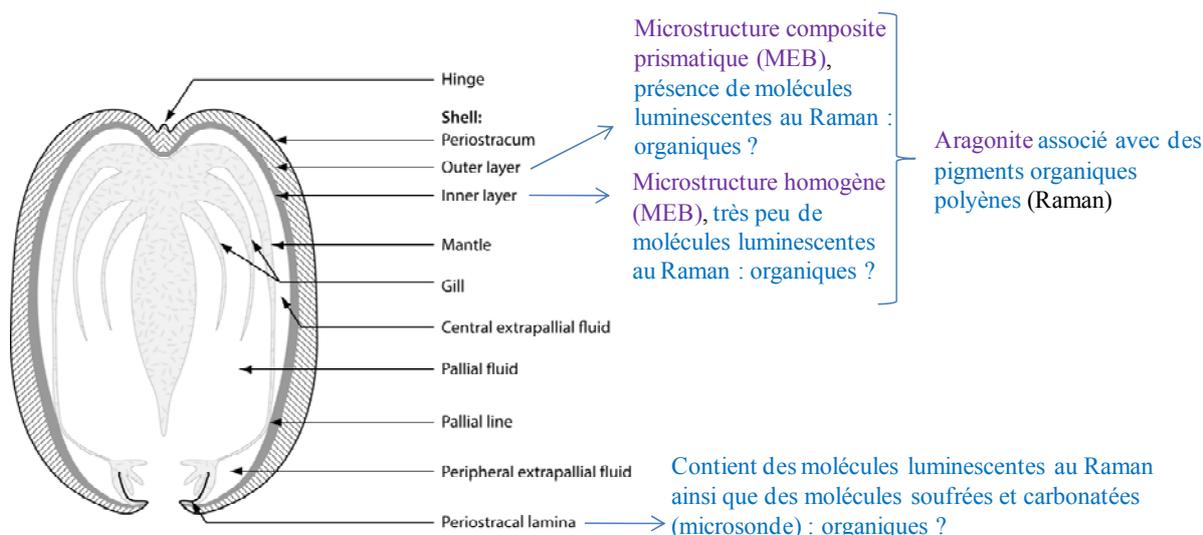


Figure 1 : Coupe d'une palourde japonaise afin de montrer l'apport des travaux de cette thèse sur les palourdes non symptomatiques, **violet** : confirmations de travaux antérieurs, **Bleu** : résultats exclusifs de cette thèse, schéma modifié d'après (Paillard, 2004b)

3. L'apparition et la description du dépôt brun

Les différentes techniques utilisées pendant cette thèse ont permis d'approfondir les connaissances sur l'apparition et la nature du dépôt brun (Articles 1-5). Les nouvelles découvertes apparaissent en bleu sur la figure 2.

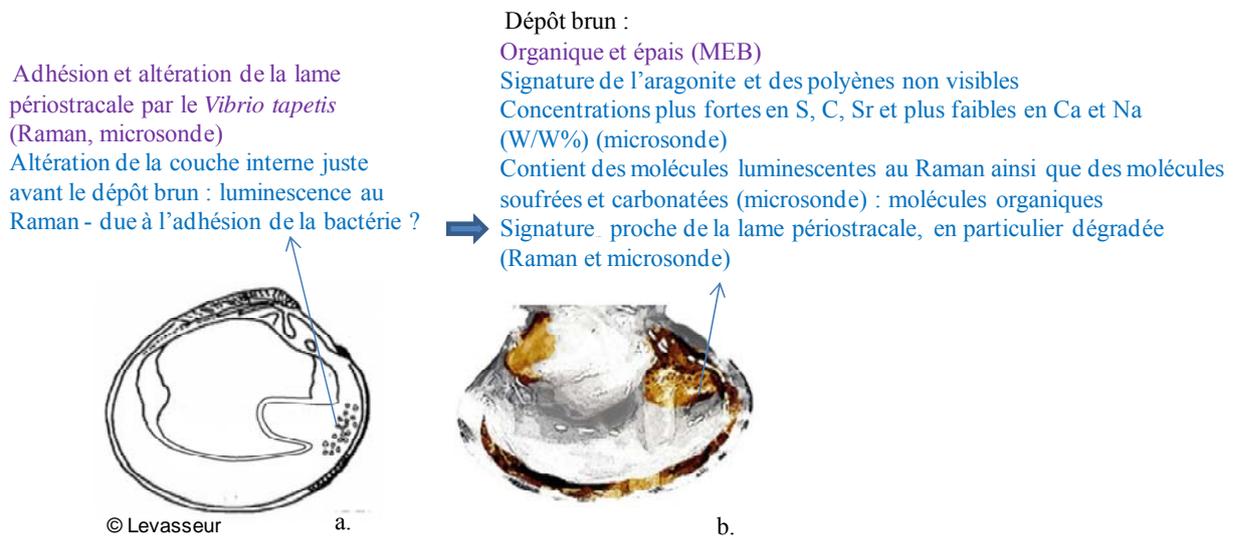


Figure 2 : Etapes de la formation du dépôt brun lors de la Maladie de l'Anneau Brun, chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*. a. Colonisation du *V. tapetis* sur la couche interne de la coquille au niveau de la lame périostracale ; vue d'un animal vide, b. apparition du dépôt brun sur la zone infectée ; vue d'un animal vide, violet : confirmations de travaux antérieurs, Bleu : résultats exclusifs de cette thèse

4. La réparation coquillière

La réparation coquillière de la palourde japonaise face à la MAB est le cœur du travail de cette thèse. Comme ce processus a été très peu étudié auparavant, presque tous les résultats sont nouveaux (bleu, figure 3). Ce phénomène avait seulement été décrit aux niveaux macroscopiques et un peu microscopiques (loupe binoculaire et histologie). Les résultats obtenus pendant cette thèse sont présentés dans la figure suivante en fonction du niveau de leur échelle d'étude (rouge) et en fonction de l'outil utilisé (souligné) (figure 3). Les perspectives de recherches dans ce domaine apparaissent en orange (figure 3).

MEB

Durant le processus de réparation, des cristaux de calcium sont progressivement déposés sans organisation particulière, jusqu'à ce que la zone affectée soit totalement recouverte. A la fin du processus de réparation coquillière, une couche organique finale recouvre entièrement ces cristaux. ➡ Lame périostracale régénérée?

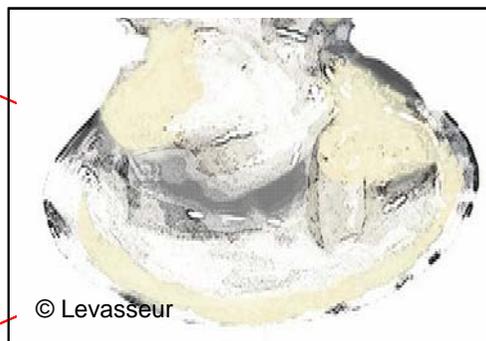
Les zones réparées montrent des microstructures qui ressemblent parfois à la microstructure homogène de la couche interne. Cependant quelques différences sont observées, comme le développement de cristaux aciculaires en chevrons, de cristaux de type prismatique, de cristaux en sphérulites et de cristaux quadrangulaires. Ces microstructures de réparation sont très variables d'un individu à l'autre, mais aussi dans un même individu au cours du temps.

Niveau microstructurel

Niveau cellulaire

Coloration des hémocytes avec Von Kossa

Au début de la réparation coquillière les hémocytes se chargent intensément en sels insolubles de carbonate de calcium dans tous les fluides (hémolymphe, extrapalléaux). Puis ces hémocytes chargés sont transportés dans les fluides extrapalléaux, au niveau des sites de réparation.



La réparation coquillière

Niveau ionique

Microsonde WDS

Après le dépôt brun, soit au début du processus de réparation coquillière, la concentration en S a un assez haut niveau. Elle décroît ensuite jusqu'à atteindre un niveau similaire à celui retrouvé dans les coquilles saines.

Système immunitaire?
Types cellulaires ?

Modélisation?

Micro-spectrométrie Raman

L'aragonite est toujours présent dans la couche de réparation.
Des pigments polyènes apparaissent quand la réparation est bien avancée.
Après le dépôt brun, au début du processus de réparation coquillière, la luminescence est à un niveau assez haut, avant de décroître pour atteindre un niveau similaire à celui trouvé dans les coquilles saines.

Niveau moléculaire

Biochimie-sérologie

Les matrices organiques des couches de réparation coquillière montrent une certaine hétérogénéité. En effet, elles sont partiellement ou totalement différentes de celles de coquilles saines, aux niveaux quantitatifs et qualitatifs : 75 à 2000 fois plus de matrice organique (W/W %), plus insoluble, des profils électrophorétiques et sérologiques différents.

Marqueurs des dépôts bruns ?

- Séquences protéiques?
- Marquages immuno-histochimiques?
- Immunogold?

Conclusion et perspectives

Figure 3 : Résultats obtenus durant cette thèse sur la réparation coquillière d'une palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*, après une attaque par le *Vibrio tapetis* et le développement d'un anneau brun ; vue d'un animal vide, **Bleu** : résultats exclusifs de cette thèse, **orange** : perspectives, **rouge** : niveau d'étude

Tous les résultats présentés dans la figure 3 montrent que la couche de réparation coquillière présente des différences avec la couche interne saine, notamment en termes de microstructure et de matrice organique. Par ailleurs, cette réparation coquillière présente des paramètres très variables d'un individu à l'autre mais aussi dans le temps chez un même individu (épaisseur). Une hypothèse est que cette différence saine-réparée et cette variabilité seraient dues à une modification du régime sécrétoire des cellules calcifiantes du manteau, ainsi que à une mobilisation d'hémocytes préalablement chargés en sels insolubles de carbonate de calcium au niveau des sites de réparation coquillière (articles 1-5).

A la fin du processus de réparation coquillière, une couche organique a été observée au MEB. Elle recouvre entièrement les amas de cristaux de calcium. Cette couche a un aspect semblable à celui de la lame périostracale observée chez des palourdes saines. Une hypothèse est que cette couche organique serait la nouvelle lame périostracale ou la lame régénérée permettant à la palourde un retour à une biominéralisation « normale » (articles 1-2).

Le phénomène de luminescence a souvent été observé sur les spectres Raman durant cette thèse. Il serait lié à la présence de molécules organiques luminescentes, mais comme aucun pic vibrationnel correspondant n'a été détecté, ce n'est qu'une hypothèse. Il en va de même pour les résultats obtenus avec la microsonde WDS. La forte concentration en soufre correspond sans doute à la présence d'une quantité importante de composés organiques sulfatés. Dans l'avenir, cette concentration en soufre ainsi que la luminescence mesurée au Raman pourraient être utilisés comme des marqueurs afin de détecter les anciens épisodes d'anneau brun dans des coupes de palourdes.

Les anticorps polyclonaux développés à la fin de cette thèse contre des fractions protéiques spécifiques de la couche interne saine de palourdes, n'ont été que partiellement utilisés (article 4). Ces anticorps représentent en effet des outils intéressants pour localiser par immunohistologie les cellules responsables de la calcification « normale » et celles impliquées dans la réparation, dans le manteau ou les fluides (hémolymphe, extrapalléaux). De plus, ils pourraient également être utilisés pour localiser la matrice organique spécifiquement marquée par ces anticorps dans les coquilles par immunogold. Le séquençage

Conclusion et perspectives

des protéines reconnues par les anticorps pourrait également être réalisé. De plus, la coloration Von Kossa pourrait être utilisée sur le manteau. Toutes ces expérimentations vont être réalisées dans le cadre du demi Poste d'ATER à l'Université de Bretagne Occidentale que je vais exercer en 2009-2010.

Par ailleurs, les données sur les quantifications précises de la matrice organique dans les couches de réparation ainsi que celles sur le rôle des hémocytes dans le transport du calcium et dans le système immunitaire pourraient être utilisées afin de mettre à jour le modèle *V. tapetis*-palourde-environnement (cf. 3. 4. 4. ; articles 2-4).

Enfin, un autre travail a été effectué durant cette thèse mais n'a pas été présenté dans ce manuscrit. Dans un premier temps, une réparation coquillière a été induite sur la moitié d'un lot de palourdes en injectant du *Vibrio tapetis* dans leur cavité palléale et en augmentant la température. L'autre moitié du lot a été injectée avec de l'eau de mer stérile filtrée. Quatre semaines plus tard la moitié des palourdes injectées avec le *V. tapetis*, ainsi que la moitié des palourdes témoins ont été injectées avec le *V. tapetis* dans la cavité palléale. Les autres palourdes ont alors été injectées avec de l'eau de mer stérile filtrée. Ce travail a permis de caractériser et comprendre l'influence du processus de la réparation coquillière sur la résistance des palourdes japonaises à une deuxième attaque de bactéries. Les paramètres qui ont été mesurés sont le stade d'avancée de la maladie (CDS), le stade de réparation coquillière (SRS) et les paramètres immunitaires : le nombre total d'hémocytes, leur pourcentage de mortalité, leurs activités d'adhésion et de phagocytose et les Espèces Réactives de l'Oxygène. Cette expérience a été faite 3 fois et dans tous les cas les résultats montrent que les palourdes ayant déjà été injectées une fois avec le *V. tapetis* présentent un meilleur taux de réparation coquillière que celles qui n'ont été injectées qu'une fois avec le *V. tapetis*. Une hypothèse pour expliquer ces résultats est que le mécanisme de réparation coquillière est déclenché dès la première injection et est donc déjà opérationnel lors de la deuxième. Le traitement de ces données est en cours, ainsi que la rédaction d'un article. Il serait intéressant de regarder si les hémocytes qui sont actifs dans le cadre du système immunitaire sont les mêmes que ceux qui sont impliqués dans le transport du calcium, ou si il en existe 2 types différents.

En conclusion, cette thèse a permis de caractériser le processus de réparation coquillière impliqué dans la guérison et la résistance des palourdes face à la MAB. La couche de réparation est composée d'aragonite, de polyènes, de molécules luminescentes au Raman et de molécules sulfatées. La microstructure de la couche de réparation est souvent

différente de celle de la couche interne non symptomatique et montre une grande variabilité. De plus, la matrice organique coquillière de la couche de réparation est quantitativement et qualitativement différente de celle de la couche interne saine et montre également une grande variabilité. Cette différence saine-réparée et cette variabilité pourraient être expliquées par une modification du régime sécrétoire des cellules calcifiantes du manteau, ainsi que par une mobilisation d'hémocytes préalablement chargés en sels insolubles de carbonate de calcium au niveau des sites de réparation coquillière.

Annexe 1 - Techniques d'observation

1. Introduction

L'objectif de cette thèse est de mieux comprendre la réparation coquillière de la palourde japonaise face à la MAB. C'est dans cette optique que différentes techniques physico-chimiques pointues et précises ont été utilisées. Le but de cette annexe 1 est de décrire l'histoire, le principe et les applications de ces techniques expérimentales.

2. Le Microscope Électronique à Balayage (MEB)

2. 1. Introduction

Comme la résolution de la microscopie optique est assez limitée ($0.2\mu\text{m}$), d'autres outils ont été créés afin de détecter des détails plus petits. Pour ce faire, il est nécessaire de diminuer la longueur d'onde du rayonnement émis. C'est pour cette raison que des électrons accélérés ont été utilisés. Le MEB est notamment utilisé pour observer la microstructure des coquilles de mollusques.

2. 2. Histoire

Un projet de MEB a été inventé pour la première fois en Allemagne dans les années 1930 par Knoll et Von Ardenne. Ensuite, en 1940, Zworydin, Hillier et Snyder ont développé ce MEB. Suite aux progrès techniques de la télévision et des détecteurs d'électrons et grâce aux recherches de Oatley et de son équipe de Cambridge, le MEB a connu un véritable essor entre 1948 et 1965.

2. 3. Principe

Un échantillon est soumis à un faisceau d'électrons accélérés. Sous l'impact de ce faisceau, l'échantillon émet principalement des électrons rétrodiffusés, des électrons secondaires et des rayons X. Ces électrons sont ensuite recueillis sélectivement par des détecteurs qui transmettent un signal à un écran cathodique. Le balayage de cet écran est exactement synchronisé avec le balayage de l'objet, donc avec le faisceau incident. C'est le principe du balayage. Ceci consiste à analyser la surface d'un échantillon par lignes successives. Pour ce faire, les MEB utilisent un faisceau très fin qui balaye point par point la surface de l'échantillon.

Les électrons rétrodiffusés et les électrons secondaires ne sont pas les seuls à donner des informations. Les électrons Auger, les électrons transmis, la cathodoluminescence et les rayons-X peuvent également être analysés par certains MEB.

2. 3. 1. Les électrons secondaires

Sous l'effet du bombardement des électrons primaires, des électrons incidents de faible énergie (environ 50 eV) sont arrachés des couches périphériques des atomes se trouvant à la surface de l'échantillon. Chaque électron primaire peut ainsi donner un ou plusieurs électrons secondaires. Seuls les électrons secondaires proches de la surface de l'échantillon sont détectés. Ceci permet d'obtenir une image avec une bonne résolution (3-5 nm), montrant principalement la topographie de l'échantillon.

2. 3. 2. Les électrons rétrodiffusés

Quand les électrons bombardés pénètrent plus en profondeur dans l'échantillon, ils interagissent avec le noyau des atomes de l'échantillon. Les électrons sont ainsi réémis dans une direction proche de leur direction d'origine et avec une faible perte d'énergie (30 eV). Ils sont détectés quand ils ressortent de l'échantillon. L'image résultante a une moins bonne résolution que celle obtenue avec les électrons secondaires (6-10 nm) mais donne des informations sur la topographie et sur la composition chimique de l'échantillon (contraste en fonction du numéro atomique).

La figure 1 représente le schéma d'un MEB avec sa colonne, son ensemble électronique et son système d'analyse et de traitement des données.

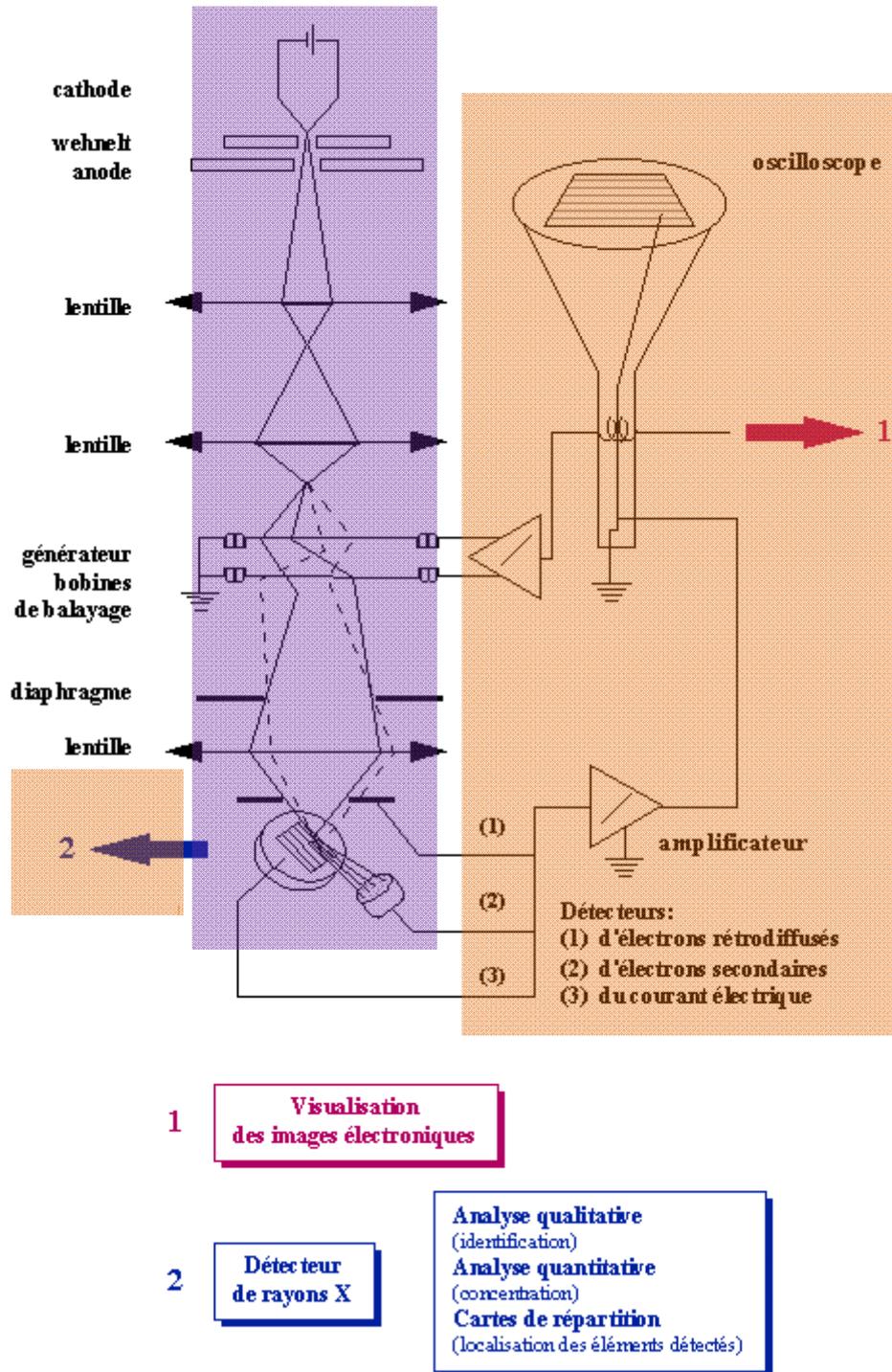


Figure 1 : Représentation schématique d'un microscope électronique à balayage équipé d'un système de microanalyse de rayons X, violet : colonne, orange : ensemble électronique et système d'analyse et de traitement des données, d'après (Duval et Bouquillon, 2009)

2. 3. 3. Préparation des échantillons

Pendant l'analyse, l'échantillon reçoit un très grand nombre d'électrons. Les échantillons conducteurs écoulent cette charge d'électrons à travers le porte-objet. Les échantillons électroniquement isolants présentent des phénomènes de charges altérant le signal. C'est pourquoi, ils sont recouverts d'un dépôt conducteur d'or ou de carbone transparent aux électrons avant toute observation (Duval and Bouquillon, 2009 ; fr.wikipedia.org).

2. 4. *Applications*

Le microscope électronique à balayage est un outil qui est fortement utilisé pour observer les microstructures des coquilles de mollusques depuis les années 1950. Il a permis de comprendre les mécanismes de réparation coquillière de nombreux mollusques comme par exemple, *Haliotis tuberculata* (Fleury et al., 2008), *Helisoma duryii duryii* (Wong et Saleuddin, 1972), *Helix pomatia* (Saleuddin, 1971), *Mytilus edulis* (Meenakshi et al., 1973 ; Uozumi et Suzuki, 1979), *Nautilus macrophalus* (Meenakshi et al., 1975), *Pinctada margaritifera* (Caseiro et Gauthier, 1997, 1998) et *Pomacea paludosa* (Blackwelder et Watabe, 1977).

Par ailleurs, quelques travaux d'observation des coquilles de palourdes japonaises saines ont été effectués au MEB (Taylor *et al.*, 1973 ; Shimamoto, 1986 ; Popov, 1992 ; Paillard et Le Pennec, 1993 ; Fujikura *et al.*, 2003) ainsi que les palourdes atteintes de la maladie de l'anneau brun (Paillard *et al.*, 1994 ; Paillard et Maes, 1995a, b). C'est avec l'aide de cet instrument que Taylor et al. (1973), Popov (1992) et Shimamoto (1986) ont confirmé les résultats de Boggild (1930b) obtenus au microscope optique, montrant que la coquille de la palourde était constituée de 2 couches : une composite prismatique et l'autre homogène (cf. 2. 4. 4.).

3. La micro-spectrométrie Raman

3. 1. *Introduction*

En général, quand un échantillon est soumis à une irradiation monochromatique, la majeure partie du faisceau incident est transmise. Cependant, certains échantillons diffusent de la lumière en modifiant légèrement sa fréquence. Une diffusion est un changement de direction de la propagation n'obéissant pas aux lois de l'optique géométrique. Ce décalage en fréquence correspond à un échange d'énergie entre le rayon lumineux et le milieu. Il se traduit par un changement de longueurs d'onde. Ce phénomène physique correspond à la diffusion inélastique d'un photon. C'est le phénomène optique appelé « effet Raman » ou « diffusion Raman ».

Cet effet Raman peut avoir pour origine soit les vibrations du cristal ou de la molécule analysés, soit des excitations magnétiques. Dans le cas des vibrations d'une molécule, l'irradiation monochromatique de photons produit des interactions entre les atomes de la molécule. Ces interactions ont pour conséquence des vibrations des atomes les uns par rapport aux autres en 3 dimensions, et au niveau de leur liaison covalente. C'est ainsi qu'ils diffusent la lumière selon l'effet Raman.

La spectrométrie Raman est un outil qui donne des informations sur les molécules et en particulier sur la nature des liaisons chimiques entre les atomes de l'échantillon en utilisant ce décalage de la longueur d'onde. L'apparition du laser a permis à cette technique de se répandre à grande échelle dans l'industrie et la recherche. Cet outil est notamment utilisé pour étudier les coquilles de mollusques.

3. 2. *Historique*

Chandrashekhara Venkata Râman (figure 2) était un professeur indien de physique. En 1922, paraissait son livre sur "la diffraction moléculaire de la lumière". Ce fut la première étape du travail qu'il a effectué avec ces collaborateurs et qui l'ont mené, le 28 février 1928, à découvrir l'effet optique nommé Raman. Pendant que C. V. Raman et K. S. Krishnan décrivaient l'effet Raman en 1928, totalement indépendamment Grigory Landsberg et Leonid Mandelstam le découvraient également. Raman a obtenu le prix Nobel de physique en 1930 pour son travail sur la diffusion de la lumière, soit pour la découverte de l'effet Raman.



Figure 2 : Portrait de Chandrashekhara Venkata Raman

3. 3. *Principe*

3. 3. 1. Effet Raman

La réponse d'une molécule possédant deux niveaux d'énergie de vibration ($v=1$ et $v=2$) suite à la soumission à une onde électromagnétique dépend de la fréquence et donc de l'énergie des photons incidents. Deux phénomènes de réponse sont possibles : l'absorption ou la diffusion. Dans le cas de l'absorption, en particulier infrarouge, le photon incident a la même énergie qu'un niveau de vibration. C'est le principe de la spectroscopie infrarouge. Dans le cas de la diffusion, le photon incident a une énergie bien supérieure aux niveaux de vibration. Trois types de diffusion sont possibles. Si le photon incident et diffusé ont la même énergie, c'est la diffusion *Rayleigh* ou « élastique ». Quand il y a une modification de la longueur d'onde, la diffusion est dite « inélastique. » Si le photon diffusé a une énergie plus faible que le niveau $v=1$, le photon incident a cédé à la molécule au repos une quantité d'énergie correspondant à l'énergie de vibration nécessaire à la transition de l'état fondamental E_0 ($v=0$) à l'état excité E_1 ($v=1$), c'est la diffusion *Raman stokes*. Si le photon diffusé a une énergie plus grande que le niveau $v=1$, la molécule cède au photon incident une quantité d'énergie correspondant à l'énergie de vibration de la transition de l'état excité E_1 ($v=1$) à l'état fondamental E_0 ($v=0$), c'est la diffusion *Raman anti stokes* (figure 3).

Cependant, les pics stokes et anti-stokes ont une intensité de diffusion plus faible que les Rayleighs. Sur un million de photons diffusés, seul un photon ne présente pas une diffusion Rayleigh. De ce fait, un filtre est positionné au niveau de cette diffusion Rayleigh, afin qu'elle ne masque pas le signal du spectromètre Raman. De plus, les photons diffusés

stokes sont plus étudiés que les anti-stokes car l'intensité de leurs pics vibrationnels est plus élevée. Ceci est dû au fait que leur quantité d'énergie est moins élevée (figure 3).

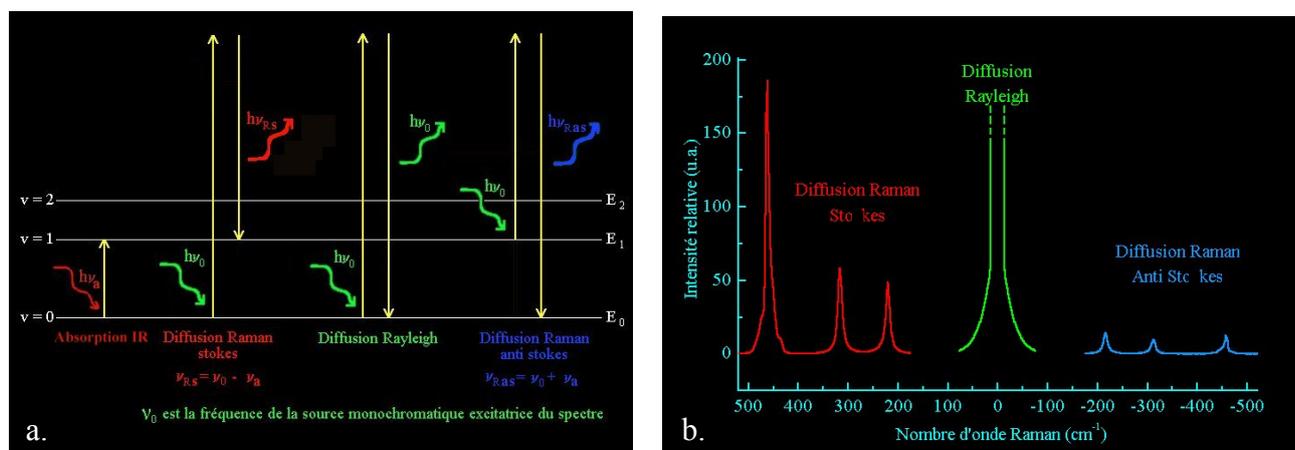


Figure 3 : Effet Raman, a. l'absorption et les diffusions, b. le spectre des pics vibrationnels d'après (lcepe.cnrs-nancy.fr/GRAUS/raman/principeraman.htm)

3. 3. 2. Spectrométrie Raman

La « spectrométrie Raman », appelée aussi « spectroscopie Raman », est un outil d'analyse non-destructeur. Il est capable de caractériser la composition chimique et la structure d'un matériau. Comme la spectrométrie infrarouge, la spectrométrie Raman permet d'étudier les modes vibrationnels d'un matériau. Ces deux techniques sont complémentaires.

Lors d'une analyse avec cette technique, un faisceau laser de lumière monochromatique est focalisé à l'aide d'une lentille sur l'échantillon. La lumière diffusée est alors recueillie à l'aide d'une autre lentille et envoyée sur un monochromateur. Ensuite, son intensité est mesurée avec un détecteur (monocanal type photomultiplicateur : CPM, ou multicanal type CCD). La lumière diffusée est collectée soit à 180°, soit à 90°. La polarisation des faisceaux incidents et diffusés peut également être modifiée.

Le décalage en longueur d'onde dû à l'effet Raman dépend directement de la matière et lui est caractéristique. C'est pourquoi, il ne dépend pas de la longueur d'onde du faisceau de lumière monochromatique incident.

La spectrométrie Raman est une technique précise car le faisceau laser n'est focalisé que sur une petite partie de l'échantillon. Quand ce volume n'atteint que quelques microns cube, et qu'un microscope est couplé au spectromètre Raman, la technique d'analyse est appelée « micro-spectrométrie Raman ».

Le signal obtenu est sous forme de pics vibrationnels (Stokes et anti-Stokes). Ces pics sont caractéristiques de la composition chimique de l'échantillon, de sa structure cristalline, ainsi que de ses propriétés électroniques. La spectrométrie Raman est principalement utilisée pour la chimie, l'œnologie et la bijouterie. Son atout est qu'elle permet de caractériser vibrationnellement ou chimiquement un objet à température ambiante, sans le détruire et avec peu de préparation (lcpce.cnrs-nancy.fr/GRAUS/raman/principeraman.htm ; fr.wikipedia.org).

3. 4. Applications

La spectrométrie Raman est particulièrement intéressante pour étudier les coquilles de mollusques car elle permet d'obtenir des informations à la fois sur les composantes minérales et organiques de la coquille. De plus, les analyses se font directement sur l'objet solide, permettant ainsi une localisation très précise, et évitant une dissolution chimique des coquilles.

La micro-spectrométrie Raman est donc une technique non-destructive qui est bien connue pour fournir des analyses qualitatives et quantitatives sur de nombreux composés minéraux et organiques de la coquille. La micro-spectrométrie Raman est par exemple utilisée pour étudier les différents polymorphes de carbonates de calcium dans des cristaux synthétiques (Kontoyannis et Vagenas, 2000 ; Carteret *et al.*, 2009) ou chez des mollusques (Urmos *et al.*, 1991 ; Weiss *et al.*, 2002 ; Gotliv *et al.*, 2003 ; Withnall *et al.*, 2003 ; Lécuyer *et al.*, 2004 ; Brink et Van Der Berg, 2005 ; Rousseau *et al.*, 2005a ; Hedegaard *et al.*, 2006 ; Jing *et al.*, 2007 ; Yan *et al.*, 2007 ; Jacobs *et al.*, 2008 ; Takeuchi *et al.*, 2008), **mais jamais chez la palourde japonaise**. Carteret *et al.*, 2009 et Kontoyannis et Vagenas, 2000, ont montré que la signature Raman spécifique de l'aragonite était constituée de 5 à 19 pics entre 111 et 1462 cm^{-1} , celle du calcite de 5 à 7 pics entre 118 et 1430 cm^{-1} , et celle de la vaterite de 5 à 17 pics entre 105 et 1465 cm^{-1} .

Dans une moindre mesure, la micro-spectrométrie Raman a également été utilisée pour étudier les composés organiques associés à ces composés minéraux, en particulier les pigments comme les caroténoïdes (Zhang *et al.*, 2001 ; Withnall *et al.*, 2003 ; Brink et Van Der Berg, 2005) et les polyènes (Hedegaard *et al.*, 2006). Les polyènes ont été trouvés la première fois en 2006 dans les coquilles de 18 mollusques dont 4 bivalves: *Mytilus edulis*, *Chlamys senatoria*, *C. Mauritana* et *Spondylus pinceps* (Hedegaard *et al.*, 2006). Avant cette étude, les pigments identifiés dans la coquille des mollusques avec la micro-spectrométrie Raman étaient des caroténoïdes (Zhang *et al.*, 2001 ; Withnall *et al.*, 2003 ; Brink et Van Der

Berg, 2005). Ils ont en effet été mesurés dans les coquilles de *Pinctada martensii*, *Hyriopsis cumingii* (Zhang et al., 2001), *Littorina littorea*, *Nautilus sp.*, *Mercenaria sp.* (Withnall et al., 2003) et *Patella granatina* (Brink et Van Der Berg, 2005).

4. La microsonde WDS (Wavelength Dispersive Spectroscopy)

4. 1. *Introduction*

La microsonde de Castaing appelée aussi « electron probe microanalyser : EPMA » est une méthode d'analyse élémentaire, basée sur le bombardement de l'échantillon par des électrons et l'analyse des rayons X émis qui en résultent. Il existe deux types de microsonde. La microsonde par dispersion de l'énergie (ou EDS pour *Energy Dispersive Spectroscopy*) ; le détecteur est alors un semi-conducteur qui produit des pics de tension proportionnels à l'énergie du photon, et la microsonde par dispersion de longueur d'onde (ou WDS pour *Wavelength Dispersive Spectroscopy*) ; c'est-à-dire que les photons X sont séparés par diffraction sur un cristal. Ces microsondes sont souvent couplées à un microscope électronique à balayage. La microsonde WDS est un outil analytique très performant permettant la détermination qualitative et quantitative, à l'échelle du micron cube, des éléments chimiques contenus dans des matériaux très divers : roches, alliages métalliques, poudre et objets carbonatés. Cet outil est depuis peu utilisé sur les pièces calcifiées.

4. 2. *Historique*

La première microsonde a été inventée et construite en 1951 par le Professeur Castaing. Depuis lors, cet outil a été produit à quelques centaines d'exemplaires et vendues dans le monde entier par la firme française Cameca.

4. 3. *Principe*

Le principe de la microsonde Wave-length Dispersive Spectrometry (WDS) est de bombarder une faible surface (1 micron carré) d'un échantillon avec un faisceau d'électron préalablement réduit par deux ou trois lentilles magnétiques, avec une énergie d'impact allant de quelques centaines d'eV jusqu'à 50 keV. Ces électrons chargés en énergie pénètrent dans l'échantillon et interagissent avec ses atomes afin de générer de petites quantités de rayons X. En effet, certains électrons cèdent une partie de leur énergie cinétique à l'atome, provoquant ainsi l'éjection d'un électron de l'atome. L'atome est dit « excité ». Si l'électron éjecté est proche du cœur, un électron périphérique descend (l'atome se désexcite). En ce faisant, il émet

un photon. Du fait de l'énergie de transition, ce photon appartient au domaine des rayons X. Tous les éléments chimiques connus produisent une série de rayons X spécifiques et connus. Ces rayons X sont détectés à des longueurs d'ondes particulières par 5 spectromètres à rayons X de type WDS (dispersion de longueur d'onde), et ce en utilisant la diffraction sur un cristal. Leurs intensités sont mesurées afin de déterminer la concentration des différents ions formant l'échantillon dans le faible volume concerné (1 micron cube) (figure 4).

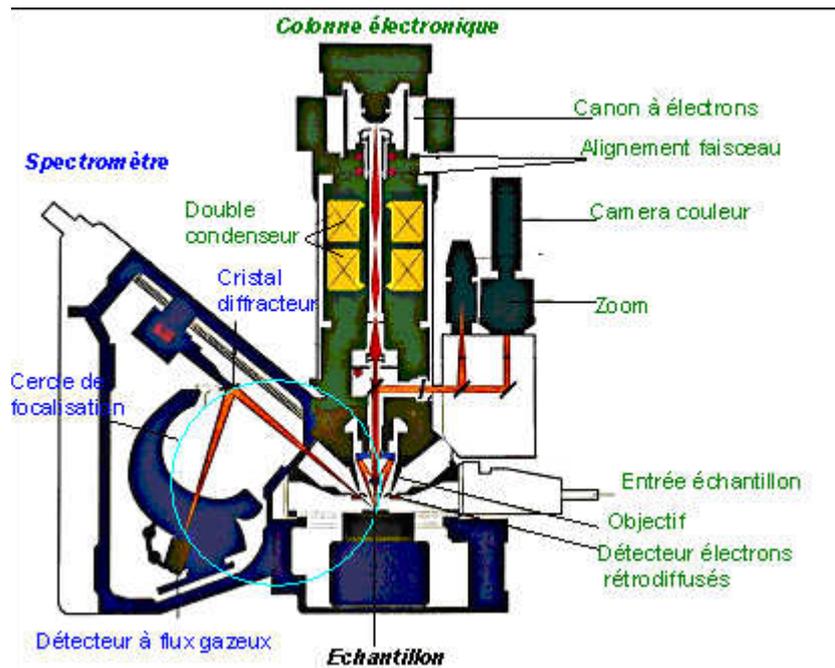


Figure 4 : Schéma d'une microsonde WDS d'après (www.gm.univ-montp2.fr/spip/spip.php?article111)

Les intensités de ces rayons-X peuvent être quantifiées (de l'ordre de 100 ppm) en utilisant des standards calibrés. Deux principaux types de résultats sont obtenus : des transects de mesures quantitatives, et des cartographies semi-quantitatives. Tout type de matériaux peut être analysé : minéral, végétal, animal, synthétique ou composite. Par ailleurs, les intensités des rayons-X émis par les éléments légers sont de faible intensité, leur détection et leur quantification sont de ce fait très difficiles.

Un ordinateur pilote le processus d'analyse et l'exploitation de ces résultats (www.univ-brest.fr/index.php?page=affiche_composante&object=msouest ; fr.wikipedia.org ; www.gm.univ-montp2.fr/spip/spip.php?article111).

4. 4. Applications

La microsonde WDS est couramment utilisée pour effectuer des analyses sous forme de cartographies ou de transects de rayons-X, afin de localiser les éléments traces dans les minéraux des roches et de quantifier leur concentration. Cet outil a été adapté à partir de ces études géologiques pour faire des mesures sur les coquilles de mollusques ou d'autres pièces biominéralisées carbonatées. Dans un premier temps, cet outil a été utilisé chez les otolithes de poissons pour la cartographie ionique des concentrations en calcium et strontium (Gunn *et al.*, 1992 ; Otake *et al.*, 1994 ; Otake *et al.*, 1997 ; Tzeng *et al.*, 1997 ; Diouf *et al.*, 2006 ; Labonne *et al.*, 2009). Cette méthodologie des otolithes a ensuite été adaptée pour étudier les coquilles de mollusques. La microsonde WDS a été utilisée sur des coquilles de mollusques pour des transects (Crenshaw et Ristedt, 1976 ; Wada, 1980 ; Lindh *et al.*, 1988 ; Coote et Trompetter, 1995 ; Fujikura *et al.*, 2003 ; Kuczumow, 2004 ; Jacobs *et al.*, 2008 ; Takesue *et al.*, 2008) et occasionnellement pour des cartographies de rayons-X (Coote et Trompetter, 1995 ; Kuczumow, 2004).

Dans les formations calcifiées formées de carbonate de calcium, les éléments traces en faible concentration peuvent être des traceurs des conditions environnementales comme le strontium (Klein *et al.*, 1996 ; Stecher III *et al.*, 1996 ; Takesue *et al.*, 2008), ou être des traceurs de la matrice organique comme le soufre (Addadi *et al.*, 1987 ; Dauphin *et al.*, 2003 ; Nudelman *et al.*, 2006 ; Treccani *et al.*, 2006 ; Guzman *et al.*, 2007 ; Marie *et al.*, 2007 ; Marin *et al.*, 2008). Le strontium a le même rayon ionique que le calcium et peut être partiellement remplacé par lui dans les biominéraux. Cette incorporation dépend du taux de croissance, de la microstructure coquillière, de la maturité de l'animal et des facteurs environnementaux comme la salinité ou le ratio Sr/Ca de l'eau environnante (Klein *et al.*, 1996 ; Stecher III *et al.*, 1996 ; Diouf *et al.*, 2006 ; Takesue *et al.*, 2008 ; Labonne *et al.*, 2009). Le carbone, quant à lui, est à la fois présent dans le carbonate de calcium (CaCO₃) et dans la matrice organique comme les protéines, les polysaccharides et les lipides. Dans les biominéraux, le calcium et le sodium sont présents uniquement dans les cristaux de calcium, en particulier dans l'aragonite pour le sodium (Cuif *et al.*, 1986).

Annexe 2- Experimental infections of corkwing wrasse, *Symphodus melops*, and Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, with three *Vibrio tapetis* and *V. tapetis* - like isolates. *In Prep*

Lisbeth S. Harkestad¹, Christine Paillard², Anne Grete Eriksen¹, Nolwenn Trinkler², Claire Sintès², Nelly Le Goïc², Stein Mortensen¹

- 1: Institute of Marine Research, PO.Box 1870, Nordnes, N-5817 Bergen, Norway.
- 2: Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM). LEMAR. UMR 6539. Université de Bretagne Occidentale, F-29280 Plouzané, France

Corresponding author: Stein Mortensen, Institute of Marine Research, PO.Box 1870, Nordnes, N-5817 Bergen, Norway. stein.mortensen@imr.no

ABSTRACT

Vibrio strains related to the pathogenic *Vibrio tapetis*, causing Brown Ring Disease in Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, have been isolated from native corkwing wrasse *Symphodus melops*, and introduced Manila clams seeded in Norway. The corkwing wrasse seems vulnerable to vibriosis, and we have tried to establish a challenge model for *V. tapetis* infections in corkwing wrasse. The model was applied to study the susceptibility of corkwing wrasse to *V. tapetis* and *V. tapetis* like strains under different temperature conditions. The possibilities of cross infections between Manila clams and corkwing wrasse were investigated by challenging both clams and wrasse with the French *Vibrio tapetis* type strain (CECT 4600) and the strains isolated from corkwing wrasse (LP2) and Manila clams (NRP45) in Norway. In challenge experiments with the three strains, only LP2 was re-isolated from challenged fish. This strain was also isolated from fish challenged with CECT4600 and LP2. *V. splendidus* and other undetermined vibrios were also isolated during the challenge experiments. Our results verify that LP2 is a specific pathogen of corkwing wrasse, and that this fish is vulnerable to vibriosis when kept in captivity. In challenge trials inoculating the bacteria into the pallial cavity of Manila clams, only clams challenged with the CECT 4600 strain had increased Brown Ring Disease prevalence, but injections of the three strains into the adductor muscle tissues of adult clams resulted in increased mortalities. This verifies that CECT 4600 strain is a specific pathogen of Manila clams, and indicates that the other strains may act as opportunistic pathogens. A natural cross infection of these strains between wrasse and clams seems unlikely.

KEY WORDS: Vibriosis, *Vibrio tapetis*, Corkwing wrasse, *Symphodus melops*, Manila clams, *Ruditapes philippinarum*

INTRODUCTION

The corkwing (*Symphodus melops*) is a common wrasse species on shallow water on the Norwegian west coast. It is frequently fished and used as a cleaner fish against salmon louse (*Lepeoptheirus salmonis*) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) aquaculture (Bjordal 1990, Deady et al. 1995). Under natural conditions, this species is shy, and seeks shelter and shadow. Exposed to light and without shelter, the corkwing is clearly stressed, and we have experienced that this wrasse species is vulnerable to infections by opportunistic bacteria, in particular *Vibrio* spp, when kept under presumably sub-optimal conditions in captivity. Both *Vibrio splendidus* and *Vibrio tapetis* have been isolated from corkwing wrasse suffering mortality (Jensen et al 2003, Samuelsen et al 2003). *Vibrio tapetis* is a well-known pathogen of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*), where it causes Brown Ring Disease (BRD) (Paillard et al. 1994). *V. tapetis* strains have also been isolated from other clam species, like *Ruditapes decussatus*, *Tapes aureus* and *Dosinia exoleta* with symptoms of BRD, and from asymptomatic cockles, *Cardium edule* (Paillard 2004). A strain related to *V. tapetis* was also isolated from a moribund halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (Reid et al, 2003).

Manila clams were introduced into Norway in 1987, and spat were released on several sites between 1988 and 1990 (Mortensen and Strand 2000). Recent studies have revealed Brown ring disease symptoms in recovered specimens from the 1990 seeding on a beach on the island of Seløy, south of Bergen. A *V. tapetis*-like strain named NRP45 was isolated from these clams (Paillard et al. in press). The findings of *V. tapetis* and *V. tapetis*-like isolates in wrasse and several clam species raise two questions. One is the concern for the health status of the wrasse, the other the risks concerned with possible transfer of pathogenic bacteria to other invertebrate and vertebrate species.

The aims of the present study were to establish a challenge model for *V. tapetis* infections in corkwing wrasse, study the susceptibility of corkwing wrasse to *V. tapetis* and *V. tapetis* like strains under different temperature conditions and investigate the possibility of cross-infections by challenging both Manila clams and corkwing wrasse with the French *Vibrio tapetis* type strain CECT 4600 (Borrego et al. 1996) and the LP2 and NRP45 strains isolated from corkwing wrasse and Manila clams recaptured on the release sites in Norway.

MATERIAL AND METHODS

Challenge experiments were carried out with the same bacterial isolates, performed at the Institute of Marine Research in Bergen (wrasse) and Institut Universitaire Européen de la Mer in Brest (clams) according to protocols established in the respective laboratories.

Fish

Wild corkwing wrasse with a weight range of 20 – 80 grams were captured by traps by a local fisherman in Lysefjorden, on the west coast of Norway, 30 km south of Bergen, transported to the Institute of Marine Research in Bergen and transferred directly to the experimental tanks. The fish were offered plastic tubing as hiding places. Experiments were performed in the period mid June to primo September in 2004 and 2005. At their arrival 30 fish in each of the experimental groups were sampled as controls. Fish were killed by puncturing the brain with an awl. Kidney samples from the fish were examined for the presence of bacteria as

described below. Fish were offered feed (3 mm Europa 15, Skretting), once daily from the day after challenge.

Clams

Adult Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) with a length of 35-45 mm were obtained in January 2005 from a site which exhibited low (7%) BRD prevalence (Ile aux oiseaux, Gulf of Morbihan, France). Seed with a length of 15-20 mm were obtained from the SATMAR nursery (Marennes, France).

Bacteria

Three bacterial strains were used: The *V. tapetis* reference strain CECT 4600 isolated from *R. philippinarum* (from Landéda France) in the laboratory of the University of Brest in 1990 (Paillard and Maes, 1990), named *V. tapetis* by Borrego et al. (1996), the *V. tapetis*-like NRP 45 isolated from *R. philippinarum* in Norway (Paillard et al., in press), and *V. tapetis* strain LP2, isolated from corkwing wrasse, *S. melops*, in the laboratories of the Institute of Marine Research, Bergen, Norway in September 2000 (Jensen et al, 2003).

Establishment of a challenge model for vibriosis in corkwing wrasse

Two experiments were performed in order to establish a challenge model for corkwing wrasse using the *V. tapetis* strain LP2.

Experiment 1 compared bath- and injection challenge at three different concentrations of bacteria. Fish were divided into 8 groups with 20 fish in each of eight 160 l tanks: 3 groups plus 1 control group for bath challenge and 3 groups plus one control group for challenge by injections. The water flow was 6 l x min⁻¹ and the temperature 9°C. Bacteria were grown in Difco Tryptone Soya Broth (TSB) with 15% NaCl in shaking culture at 18°C. The optical density at 600 nm was measured by a Hitachi U-1100 Spectrophotometer. The numbers of colony-forming units (CFU) per ml were assessed by a dilution series in sterile PBS and plating out on Difco 2216 Marine Agar Petri dishes, which were incubated at 18°C. Colonies were counted after 48 hours. The estimates of the CFU in the bath challenge tanks; calculated from the measurements of the CFU per ml in the bacterial cultures were 4,7 x 10⁴, 4,7 x 10⁵ and 4,7 x 10⁶ CFU ml⁻¹, respectively. The control group was added TSB medium. During challenge, the water supply was turned off and the tanks were oxygenated. The fish were kept in the bacterial suspension for 1 h, after which oxygenation was terminated and the water supply was restored. The injection culture was prepared as described above and centrifuged at 5500 g in a Qiagen 4-15 C centrifuge and then resuspended three times in sterile PBS. Fish were injected intraperitoneally with 0.2 ml of bacterial suspensions. The fish were given suspensions at 7.5 x 10², 10⁴ and 10⁶ CFU ml⁻¹ bacteria respectively. Fish in the control group were injected with 0,2 ml sterile PBS. The experiment was terminated 42 days post challenge. Mortalities were recorded, and dead fish were removed from the tanks daily. Kidney samples from dead and moribund fish were cultured for a possible re-isolation of LP2. Kidney samples from dead fish and five fish from the survivors of each group at the end of the experiments were inoculated on MERCK TCBS agar (thiosulfate citrate bile sucrose) and incubated aerobically at 18°C for 48 hours. Bacteria were identified by a yellow colony colour on TCBS agar plates, as LP2 utilize sucrose/saccharose resulting on yellow colonies on this medium. As *V. tapetis* does not grow at temperatures above 27°C (Paillard et al. 1997), yellow colonies growing on the *Vibrio*-selective TCBS medium were streaked on Marine agar and incubated at both 18 and 30°C for 48 hours. Bacterial colonies growing at 18, but not at 30°C were then tested for vibriostatic agent O/129 and selected

for further typing by API 20E (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, France), PCR and sequencing. The API 20E test were carried out according to the manufacturer's protocol with the following exceptions; the suspension of bacterial culture was done with 0,9 % autoclaved saline water to a standard opacity equivalent to McFarland No.2. The cultures were incubated at 18°C for 48 hours.

Based on the results from experiment 1, experiment 2 was performed to measure the effect of different temperatures on the mortality of wrasse using bath challenge. Fish were divided into groups with 40 fish in each of twelve 220 l tanks. The water flow was 8 l x min^{-1} . Duplicate challenge groups and one control group were kept at 6, 9, 12 and 15°C respectively. Bath challenges were performed as described above, at a final bacterial concentration of 3×10^7 CFU ml^{-1} . The experiment was terminated 21 days post challenge. Mortality was recorded, and dead fish were removed from the tanks daily. Kidney samples from dead and moribund fish were treated as described above.

Challenge of wrasse with three different *V. tapetis* strains at 12 and 15°C

After the establishment of the challenge model, a bath challenge experiment was performed in order to compare the pathogenicity of the three strains on corkwing wrasse at 12 and 15°C. Fish were divided into groups with 60 fish in each of eight 220 l tanks. Water temperature in the tanks was 9°C, increased to 12°C before challenge. The water flow was 10 l x min^{-1} . Duplicate groups were bath challenged with $5,5 \times 10^6$ LP2 per ml, $3,6 \times 10^6$ NRP 45 per ml and $1,0 \times 10^6$ CECT 4600 per ml respectively, as described above. Two groups were kept as controls, and bathed in TSB-medium. The challenge was thereafter repeated at 15°C, using $1,8 \times 10^7$ LP2, $4,04 \times 10^6$ NRP 45 and $3,9 \times 10^6$ CECT 4600 per ml. Mortalities were recorded, and dead fish were removed from the tanks daily. Kidney samples from dead and moribund fish and five fish from the survivors of each group at the end of the experiments were inoculated on TCBS agar and Marine Agar and incubated aerobically at 18°C for 48 hours.

The selection of bacteria carried forward for further analyses were performed as described above. However, as NRP 45 does not ferment glucose, all colonies from incubations on TCBS were isolated and purified, and then subjected to phenotypic and molecular identification.

Characterisation of bacteria

Isolation of DNA for PCR was performed by transferring bacterial colonies to 1 ml TSB in 2,2 ml 96 well culture blocks (Millipore) and incubated at 18°C for 48 hours. Plates were centrifuged at 5500g in a Qiagen 4-15°C centrifuge for 10 min. Supernatants were removed and each well added 200 μl of ATL Tissue lysis buffer (Quiagen) and 20 μl proteinase K solution (Quiagen). Plates were incubated at 55°C and shaken at 70 rpm over night in a Hedolph UNIMAX 1010 incubator. DNA extraction was then performed using DNAasy 96 Tissue Kit (Quiagen) according to the manufacturer's instructions. PCR reactions were performed as described by Paillard et al (2006) modified with an initial denaturing step at 95°C for 5 minutes and a final extension hold at 72°C for 10 min in a GeneAmpR PCR system 9700 (Applied Biosystem). The positive control consisted of *V. tapetis* CECT 4600 DNA while the negative control was deionized water.

Isolates that gave negative results on the PCR test were considered *Vibrio* spp, as they had been cultured on a *Vibrio* selective medium and gave positive reactions on vibriostatic agent O/129. DNA from positive PCR reactions were subjected to PCR amplification of 16S rRNA encoding gene (Weisburg et al. 1991), *gyr B* (Yamamoto and Harayama 1995) and *cpn60* (Rusanganwa et al. 1992) partial gene fragments. All PCR reactions used approximately 100

ng DNA in a 20 µl reaction, and were performed with an ABI 9700 thermal cycler (Applied Biosystems). PCR amplification of 16S rRNA encoding gene was performed with final reaction concentrations of 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 µM of each primers and 1 unit Taq polymerase (Promega). The temperature conditions consisted of an initial denaturation step of 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min, and a final extension hold at 72°C for 10 min. PCR amplification of *cpn60* was performed with final reaction concentrations of 1.88 mM MgCl₂, 0.25 mM of each dNTP, 0.25 µM of each primer and 1 unit Taq polymerase (Promega). Thermocycling consisted of an initial denaturation step of 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min, and a final extension hold at 72°C for 10 min.

PCR amplification of *gyrB* was performed with final reaction concentrations of 1.88 mM MgCl₂, 0.25 mM of each dNTP, 0.25 µM of each primer and 2.5 units Taq polymerase (Promega). Thermocycling consisted of an initial denaturation step of 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 1 min, 58°C for 1 min and 72°C for 2 min, and a final extension hold at 72°C for 7 min.

Sequencing was performed using the ABI Prism™ Big-Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.1 (Applied Biosystems), and reactions were analysed on an ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems). The gene fragments were assembled into complete sequences in ContigExpress in the Vector NTI Advance 9.0 computer package (Invitrogen). The 16S rRNA encoding gene sequence was searched for nucleotide-nucleotide matches in the BLAST database at the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) to establish initial strain identity (Altschul et al. 1990). The 16S rRNA, *gyrB* and *cpn60* sequences obtained were submitted to the GenBank (accession nos AM402968, AM399070 and AM399071 respectively).

Statistical analysis

A G-test of independence was used to compare the observed mortality between replicate groups (Sokal and Rohlf 1981) and a pairwise G-test of independence was used to compare the mortality between groups with a Bonferroni-corrected p – value (Sokal and Rohlf 1981). X² (Nolwenn)

Production of bacteria for experimental challenge of clams

Bacteria were grown on marine agar for 72h at 18°C before inoculation experiments, according to Paillard and Maes (1990). The concentration of bacteria was determined by measuring the OD at 492 nm (using relationship between OD and CFU/ml counted in petri dishes after dilution).

BRD reproduction in clam seed

In order to investigate if the three *Vibrio* strains (CECT 4600, NRP 45, LP2) may induce Brown Ring Disease in clam seed, two experiments were performed in November 2006 and May 2007 respectively. For each experiment, 800 seed were maintained for three days in an aquarium at 14°C and divided into eight batches of 100 individuals. Clams were fed daily with unicellular algae (*Isochrysis galbana* and *Dunaliella euchlora*). For each *V. tapetis* strain plus control two batches of clams were challenged after overnight immersion, as described by Paillard and Maes (1995). One hundred µl of each bacterial suspension, and sterile seawater (controls) were inoculated in the pallial cavity and the clams were maintained for 6 hours without water in humid ambient atmosphere before being placed in the aquaria and kept for 30 days (T30). The inoculation date was considered as time zero (T0). The clams were not fed during all the experiment. Dead clams were removed, counted, and the shells were kept for

BRD diagnosis. At T30, all remaining clams were sampled for BRD diagnosis. Disease prevalence and BRD stages were monitored according to the classification system of Paillard and Maes (1994), modified by Paillard (2004) and Ford and Paillard (2007) to include the shell repair stage SRS 2.5, corresponding to an almost complete recovery from BRD.

Inoculation of bacteria into tissues of adult clams

To investigate the pathogenicity of the three strains on adult manila clams, clams were maintained in an aquarium at 14°C before being divided into eight batches of 100 individuals. The clams were fed daily with unicellular algae (*Isochrysis galbana* and *Dunaliella euchlora*). Two batches were challenged with each strain, and two control groups were inoculated with sterile seawater (SSW). One hundred µl of each bacterial suspension and SSW were inoculated in the adductor muscle as described by Allam et al. (2002). The inoculation date was considered as time zero (T0). The clams were then maintained at 14° for 8 days. Clams were monitored daily. The shells of dead clams were removed from tanks and counted.

RESULTS

Experimental fish

At arrival, some fish had skin ulcerations. Bacteria were not isolated from kidney samples of control fish sampled before the experiment. All fish - including the control groups - had no appetite during the experiments, and showed a nervous behaviour.

Challenge model for vibriosis in corkwing wrasse

Experiment 1: After injection challenge with the *V. tapetis* strain LP2, mortality showed an unclear pattern, with 0 – 15 % mortality also in the control groups. The clearest differences between the groups were observed after bath challenge, with the highest mortality rate after challenge with the highest dose (Figure 1). The highest mortality was recorded between days 12 and 20 (not shown in figure). LP2 was re-isolated from all challenged groups. After injection of bacteria, mortality occurred between days 15 and 33, except in the medium dose group, where mortality occurred between days 5 and 15. LP2 was re-isolated from the medium and high dose groups, but not from the low dose group. No LP2 was isolated from dead fish after day 21 in any of the groups.

Experiment 2: Using bath challenge at 6°C, the mortality in the challenged groups was identical to the control, at an average of 3,5%. At 9°C the average mortality in the challenged groups was 21,3%, with a significant difference in mortality to the control group (pairwise G-test of independence, $p = 0,05$, $df = 1$). At 12 °C, the mortality was significantly higher in the control group than in the challenged group. Mortalities in the parallel challenged groups were also significantly different (G-test of independence, $p < 0,05$, $df = 1$). At 15°C, we observed a significantly increase in mortality compared to the other temperatures (independent G-test, $p < 0,05$, $df = 0,5$), with an average mortality of 62,5% compared to 5% mortality in the control group.

Mortality of wrasse challenged at 12 and 15°C

After bath challenge with *V. tapetis* strains CECT4600 and LP2 and the *V. tapetis*-like NRP45, there was a significantly higher mortality (pairwise G-test of independence, $p = 0,05$, $df = 1$) at 15°C than 12°C, with an exception of NRP 45, where we observed no significant difference ($p < 0,5$) in mortality between the two temperatures. No significant differences were observed between the control- and the challenged groups (figure 2). The main mortality of fish challenged with LP2 occurred before day 12, while mortalities in the other groups occurred after this stage (figures 2 and 3). Summarising API, bacterial growth at 18°C but not at 30°C, PCR and sequencing we found that LP2 was re-isolated from most fish challenged with this strain (figure 3). Strains CECT4600 and NRP45 were not re-isolated from challenged fish. At 15°C, LP2 was also reisolated from two fish challenged with NRP 45 and from two fish challenged with CECT 4600. *V. splendidus* was isolated from three fish challenged with CECT 4600. At 12°C, *V. splendidus* was isolated from 18 fish in the group challenged with NRP45, one fish challenged with LP2 and two fish challenged with CECT4600. Un-identified *Vibrio* spp were isolated from fish in all groups, including the controls (figure 3).

Experimentally induced BRD in clam seed

After bath challenge of clam seed with *V. tapetis* strains CECT4600 and LP2 and the *V. tapetis*-like NRP45, Brown ring disease symptoms was recorded in all groups at the end of the experiment, including the control groups (Figure 4). The groups challenged with CECT 4600 (BRD=90%, $p=0.000$) and LP2 (BRD=29%, $p= 0,0265$) showed a significantly increased BRD prevalence compared to the control groups (BRD=15%). BRD prevalence in the groups challenged with NRP45 were not significantly different from the controls. Mortality in all groups ranged between average of 6 and 15%.

Mortality of challenged adult clams

Groups of inoculated clams suffered mortalities ranging from 36% to 46% within a week after inoculations of bacteria into the adductor muscle tissues (figure 5). Only 4 clams died in one of the control groups, representing a mortality of 4%

DISCUSSION

The corkwing wrasse seems to be vulnerable to bacterial infections when kept in captivity (Jensen et al. 2003). A *Vibrio* sp. was isolated from captured corkwing wrasse that were suffering mortality (Samuelsen et al. 2000). This strain has been classified to the species *V. splendidus*, while a different strain, classified to *V. tapetis*, was isolated from another group of captured corkwing wrasse that were experiencing high mortality (Jensen et al. 2003). *Vibrio tapetis*, strain LP2, was later considered a primary pathogen for corkwing wrasse (Bergh and Samuelsen 2006). Our results confirm this conclusion and add information to the development of vibriosis due to the LP2 strain. Our results showed that relatively high doses in bath challenge give the highest mortality of corkwing wrasse when challenged with *Vibrio tapetis* strain LP2. The development of disease after the experimental challenges also indicate that mortality due to the LP2 infections develops within 21 days. The results are in contrast to the results from challenge trials by Bergh and Samuelsen (2006), who obtained a much higher mortality (62 and 90%) with a lower challenge dose ($2,1 \times 10^5$ CFU ml⁻¹) at a lower temperature (9°C). The divergating results may illustrate the difficulties of obtaining

standardised batches of fish or a variable health status of the fish prior to challenge. Fish used by Bergh and Samuelsen (2006) may have been stalled for too long, gradually developing vibriosis before challenge. Their experiments were ceased 12 days after challenge, at a point before we experienced the main mortality in both experimental and control groups (figure 2). The divergence may also be linked to an uncertainty related to the identification of bacteria, as Bergh and Samuelsen (2006) did not verify that the re-isolated vibrios were actually LP2.

Increasing the temperatures from 6 to 9, 12 and 15°C, we experienced an increased mortality. This may seem a paradox, as this fish thrives in temperate water, being active at shallow water during summertime. Relocation of the fish from the shallow water conditions, via collection nets to experimental tanks with limiting hiding possibilities represents radical changes for the fish. Our observation of the fish confirms our previous observations that the corkwing is stressed under experimental conditions. In general, stress may influence the results from experimental infections, and partly explain the mortality of control fish. However, in the present challenge experiments with three bacterial strains LP2, CECT4600 and NRP45, no significant differences were observed in mortalities rates between challenged and control fish. Thus, mortalities fish due to stress did not influence the relative mortalities of the different challenge groups and the subsequent re-isolation of the strains used. In spite of mortalities of control fish, a comparison of the results obtained when comparing challenge method, doses and experimental temperature conditions, our results indicate that a challenge model for corkwing wrasse should be based upon bath challenge with doses in the order of 10^6 CFU ml⁻¹ at a temperature higher than 12 °C.

Challenge experiments with the three bacterial strains LP2, CECT4600 and NRP45, at 12 and 15 °C, resulted in outbreaks of vibriosis, as shown in figures 2 and 3. After challenge with LP2, this strain was re-isolated from dead and moribund fish (figure 3). LP2 was however also re-isolated from control fish, as well as from fish challenged with the clam strains CECT 4600 and NRP45. Fish challenged with the two latter strains apparently died due to infections with *V. splendidus* and other vibrios (figure 3), as neither CECT 4600 nor NRP45 were re-isolated from moribund fish. This confirms that *V. tapetis* LP2 is a primary fish pathogen of corkwing wrasse, and that this species is in general vulnerable to vibriosis.

During the re-isolation of vibrios from wrasse, we sequenced only isolates that were PCR positive using *V. tapetis* specific primers. It is worth noting that results from the sequencing showed that some of the isolates were *V. splendidus* – not *V. tapetis*. This shows a cross reaction with *V. splendidus* in the PCR-reaction which may lead to a final mis-identification of strains (Drummond et al 2006).

Challenge experiments with Manila clams revealed a similar pattern. Of the Manila clam seed challenged with LP2, CECT4600 and NRP45, only those challenged with CECT 4600 had an increased prevalence of brown ring disease. This verifies previous results with the clam specific pathogen CECT 4600 in Manila clams (Paillard and Maes 1990), and additionally indicates that both NRP45 and LP2 are not primary pathogens for clams. Injections of these strains into the adductor muscle of adult clams however resulted in mortalities in all three groups. Such challenge is a forced entry into the circulatory system of the clam. Allam et al (2002) showed that after adductor muscle inoculation, the CECT 4600 strain was not eliminated from the haemolymph, but induced septicaemia. Additionally, Choquet et al. (2003) showed that both CECT 4600 and LP2 have cytotoxic effect on haemocytes. A comparison of these findings may explain why the three strains may cause mortalities when

they encompass the physiological barriers of the clams, and indicate that both LP2 and NRP45 could potentially act as opportunistic pathogens for clams.

In conclusion, the mortalities of corkwing wrasse in the present study illustrate the problems experienced when keeping this species in captivity. Challenge trials verify that LP2 and CECT 4600 are specific pathogens of corkwing wrasse and Manila clams respectively. The role of the NRP45, isolated from introduced Manila clams in Norway (Paillard et al. in press) remains unclear. A cross infection of these strains between wrasse and clams seems unlikely

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by The Norwegian Research Council, The Fishery and Aquaculture Industry Research Fund. . . . others? and the French-Norwegian AURORA programme. Thanks to Cecilie Skår, Hari Rudra and Rolf Hetlelid Olsen for technical assistance and to Kjetil Korsnes and Patrick Le Chevalier for valuable input on the manuscript.

REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 215:403-410.
- Allam B, Paillard C, Ford S.E. (2002). Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the aetiological agent of Brown Ring Disease (BRD) in clams. *Dis Aquat Org* 48: 221-231.
- Bergh Ø, Samuelsen OB (2006). Susceptibility of corkwing wrasse *Symphodus melops*, goldsinny wrasse *Ctenolabrus rupestris*, and Atlantic salmon *Salmo salar* smolt, to experimental challenge with *Vibrio tapetis* and *Vibrio splendidus* isolated from corkwing wrasse. *Aquacult Int*
- Bjordal, Å. (1990) Sea lice infection on farmed salmon: possible use of cleaner fish as an alternative method for de-lousing. *Can Tech Rep Fish Aquat Sci* 1761:85-89
- 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. *Int J Syst Bacteriol* 46:480-484.
- Choquet G, Soudant P, Lambert C, Nicolas JL, Paillard C (2003). Reduction of adhesion properties on *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Org* 57:109-116.
- Deady S, Varian SJA, Fives JM (1995). The use of cleaner-fish to control sea lice on 2 Irish salmon (*Salmo salar*) farms with particular reference to wrasse behaviour in salmon cages. *Aquaculture* 131:73-90.

Annexes

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*. J Shellfish Res 25: 1043-1049 Published: DEC 2006

Ford SE, Paillard C (2007). Repeated sampling of individual bivalve mollusks: Intraindividual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Fish and shellfish immunol 23:280-291.

Jensen S, Samuelsen OB, Andersen K, Torkildsen L, Lambert C, Choquet G, Paillard C, Bergh Ø (2003). Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *Vibrio tapetis* isolated from corkwing wrasse (*Symphodus melops*) suffering vibriosis. Dis Aquat Org 53: 25-31.

Mortensen, SH, Strand, Ø (2000). Releases and recaptures of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) introduced to Norway, short communication, Sarsia 85: 87-91.

Paillard C (2004). A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. Aquat Living Resour 17:426-475.

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, Maes P (1990). Étiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogenicité d'un *Vibrio* sp. CR Acad Sci Paris, Serie III 310, 15-20.

Paillard C, Maes P (1994). The brown ring disease symptom in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: Establishment of a classification system. Dis Aquat Org 19: 137-146.

Paillard, C, Maes P, Oubella R (1994). Brown Ring Disease in Clams. Ann Review Fish Dis 4: 219-240.

Paillard C, Maes P (1995). The Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. J Inv Pathol 65:91-100.

Paillard C, Korsnes K, Le Chevalier P, Le Boulay C, Harkestad L, Eriksen AG, Willassen E, Bergh Ø, Bovo C, Skår C, Mortensen S (200_). Isolation of a *V. tapetis*-like strain from introduced Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with symptoms of Brown Ring Disease in Norway. Dis Aquat Org, In press

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 variation of prevalence. Proceedings of VIIIe Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Paris, France, AEEMA publications.

Reid HI, Duncan HL, Laidler LA, Hunter D, Birkbeck TH (2003). Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated Atlantic halibut (*Hipoglossus hipoglossus* L.). Aquaculture 221: 65-74.

Annexes

Rusanganwa E, Singh B, Gupta RS (1992). Cloning of HSP60 (GroEL) operon from *Clostridium perfringens* using a polymerase chain reaction based approach. *Biochim Biophys Acta* 1130: 90-94.

Samuelsen OB, Húsgarð S, Torkildsen L, Bergh Ø (2000). The efficacy of a single intraperitoneal injection of flumequine in the treatment of systemic vibriosis in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) *J Aquat Anim Health* 12:324-328.

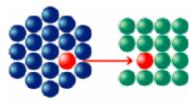
Samuelsen OB, Kvenseth PG, Andreassen JH, Torkildsen L, Ervik A, Bergh Ø (2003) the efficacy of a single intraperitoneal injection of oxolinic acid in the treatment of bacterial infections in goldsinny wrasse (*Ctenolabrus rupestris*) and corkwing wrasse (*Symphodus melops*) studied under field and laboratory conditions. *J Vet Pharmacol Therap* 26:181-186.

Sokal JB, Rohlf FJ (1981). G-test of independence, pp. 859 – 862. In: Sokal JB, Rohlf FJ (ed): *Biometry: The principles and practice of Statistics in Biological Research*. W.H. Freeman & Co., New York.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703

Yamamoto S, Harayama S (1995). PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol* 61:1104–1109.

Annexe 3- Le nouveau chapitre de thèse 2009



Association Bernard Gregory
www.abg.asso.fr



Valorisation des compétences
«un nouveau chapitre de la thèse®»

Nolwenn, Trinkler

Ecole doctorale : Ecole doctorale des Sciences de la MER

Université ou organisme de rattachement : Université de Bretagne Occidentale / IUEM

Nom du "mentor" : Yanys E. Wessels

La guérison de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise



Sujet académique de la thèse : La guérison coquillère : Un mécanisme de défense de la palourde japonaise Ruditapes philippinarum face au Vibrio tapetis dans le cadre de la maladie de l'anneau brun

Nom des directeurs de thèse : Christine Paillard et Maylis Labonne

Date probable de soutenance : Novembre 2009

Nolwenn TRINKLER NCT 2009

1

Cadre général et enjeux de ma thèse

I. Présentation succincte

1. Enjeux scientifiques, économiques et s'il y a lieu, techniques, sociétaux de mon travail de thèse

a) Introduction

Je suis une **biologiste** qui travaille à l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), à Plouzané à côté de Brest, dans le Finistère. Un biologiste a pour fonction d'étudier les **animaux**, en particulier les animaux **marins**, et de faire de la **recherche** par exemple sur leur biologie ou leur mode de vie. Plus particulièrement, je fais de la recherche sur une **maladie affectant la palourde**.

b) Enjeux scientifiques

La palourde est un **coquillage** présent sur le littoral, dans la vase. C'est un animal **invertébré** : sans squelette et c'est un **mollusque** : il a un corps mou. Il appartient à la classe des **bivalves** : il a 2 valves, soit une coquille en 2 parties.

Beaucoup de bivalves sont **comestibles**, comme l'huître, la coquille Saint Jacques, la praire, la moule, l'amande de mer, et bien sûr, la palourde.

Il existe plusieurs **espèces** de palourdes, dont deux en France : la **palourde européenne** et la **palourde japonaise** introduite en France en 1972 pour y être cultivée. En effet, elle croît plus vite et est donc plus **rentable** que son homologue européen.

c) Enjeux économiques

83% de la production de palourdes en **Europe** sont assurés par l'exploitation de la **palourde japonaise**. En 2004, un peu moins de **3 millions de tonnes** de palourdes ont été produites dans 15 pays du **monde**.

En comparaison, 4,5 millions de tonnes d'**huîtres**, 2 millions de tonnes de **moules** et 1,5 millions de tonnes de **coquilles Saint Jacques** ont été produites en 2004 dans le monde.

Le **prix** de la palourde est 4 à 5 fois plus élevé que celui de l'huître ou de la moule.

La palourde a donc un **impact économique et social** important pour les pays qui la cultive.

2. Court résumé de ma thèse, destiné à intéresser des non-spécialistes : identification claire de l'objet de l'étude et de sa finalité

En **1987** dans le **Finistère nord**, les palourdes japonaises du site de Brouënou sur la commune de Landéda, ont été décimées par une maladie : la **Maladie de l'Anneau Brun (MAB)**. Il n'y a désormais plus de culture de palourdes sur ce site car au moins **90%** des palourdes y meurent de cette maladie. Depuis, la maladie s'est développée un peu partout dans le **monde** : de la **Norvège** à la **Tunisie**.

En **1989**, des chercheurs à l'IUEM, près de Brest, ont trouvé la **cause** de la maladie : une **bactérie** appelée ***Vibrio tapetis***.

Les bactéries sont des organismes **unicellulaires** (une seule cellule). Les vibrios sont souvent la cause de maladies, comme le **choléra** chez l'homme.

Annexes

Le *Vibrio tapetis*, qui vit dans l'eau de mer, s'introduit entre les deux valves, puis **adhère** sur la face interne des **valves**.

Pour se défendre, l'organisme les englobe dans une pâte appelée **matrice brune**. Et cela forme des petits points bruns s'étendant pour donner un **anneau brun**, un collier brun. Souvent, cette réaction affaiblit les palourdes. Elles **meurent** quand le *Vibrio* réussit à rentrer dans les **tissus**, dans la chair de l'animal.

Les 3 **objectifs** de ma thèse sont :

1. **Comprendre** par quel **mécanisme** les palourdes pourraient **résister** à la MAB
 2. **Décrire** ce mécanisme qui est la **réparation coquillère** de la palourde
 3. **Créer des outils de sélection** permettant de sélectionner des familles de palourdes résistantes qui guériraient à la maladie
- Le premier objectif de ma thèse est donc de décrire comment les palourdes pourraient **résister** à la MAB.

Nous avons observé que les palourdes les plus résistantes **guérissent** quand elles **réparent leur coquille**. Pour ce faire, elles produisent une **couche de coquille** au dessus du dépôt brun. Ce phénomène est appelé la **réparation**. Seules **10%** des palourdes japonaises sont capables de guérir. Une des difficultés de la thèse est qu'il faut **tuer** les palourdes pour savoir si elles sont malades ou guéries. Il est donc impossible de faire des analyses sans tuer une palourde qui pourrait nous être nécessaire pour des **expériences ultérieures**. Par exemple, il n'est pas possible de suivre un même individu à des temps différents.

Le **deuxième objectif** est de **comprendre le mécanisme** de réparation de la palourde. Je compare la **couche réparée** avec une **couche interne saine** en regardant l'évolution de la **structure** microscopique, de la composition en **ions** et en certaines **molécules** comme les protéines ou la nature des **cristaux** (le carbonate de calcium).

Le **troisième objectif** est de tirer de ces comparaisons des **outils de sélection**. Ces outils de sélection permettront de sélectionner des **familles de palourdes résistantes** qui guériraient à la maladie.

Il serait ainsi possible de relancer de manière stable la **culture** de la palourde japonaise dans le nord-ouest de l'Europe.

II. Ma thèse dans son contexte

1. Place de ma thèse dans le projet global de mon équipe

L'IUEM : Institut Universitaire Européen de la Mer

J'effectue ma thèse au sein de l'IUEM, qui est un institut de recherche, d'enseignement et un observatoire. C'est un organisme pluridisciplinaire dont les objectifs sont d'accroître la connaissance du monde marin, d'étudier et observer les interactions de ce monde marin avec l'atmosphère et les espaces continentaux, de former des chercheurs et des cadres dans ces domaines, et de contribuer à l'observation des modifications, naturelles ou causées par l'homme, dans ce milieu. L'IUEM a été créé en 1991 par Paul Tréguer. C'est une composante majeure de l'Université de Bretagne Occidentale (UBO). Elle regroupe l'ensemble des laboratoires de l'UBO, qui relèvent des sciences de l'univers, des sciences de la vie ou des sciences de l'homme et de la société, et dont l'objet de recherche a un lien avec la Mer. L'IUEM dispose de 1100 m² de bureaux, de laboratoires et de salles de cours, sur le technopôle Brest-Iroise de Plouzané, entouré des autres composantes de l'UBO et des laboratoires mixtes de l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER). L'IUEM est un Observatoire des Sciences de l'Univers, dépendant de l'Institut National des Sciences de l'Univers. L'observatoire de l'IUEM permet de mener des séries d'observations spécifiques sur le long terme, afin de décrire et de comparer l'environnement océanique et côtier.

L'IUEM est un centre d'enseignement unique en France, autour des Sciences de la Mer et du Littoral, au sein duquel se trouvent un Master pluridisciplinaire et une Ecole Doctorale des Sciences de la Mer (EDSM). Le Master Sciences de la Mer et du Littoral a 6 mentions : droit et économie, expertise et gestion de l'environnement littoral, géosciences océan, physique et mécanique des milieux continus, sciences biologiques marines et sciences chimiques de l'environnement marin. Par ailleurs, l'EDSM assure la formation de doctorants pour et par la recherche dans le domaine des sciences de la mer, dans le cadre de thèses. J'ai effectué mon Master 1 Sciences Biologique Marine à l'IUEM et je suis inscrite à l'EDSM depuis 3 ans.

L'IUEM est le plus important centre français de recherche marine avec 250 personnels permanents et 310 étudiants en master et doctorat. L'IUEM est composé de sept laboratoires de recherche (6 UMR : Unités Mixtes de Recherche et 1 EA : Equipe d'Accueil). Le Laboratoire de Physique des Océans travaille sur les mécanismes contrôlant la dynamique des océans à différentes échelles de temps et d'espace. L'équipe de recherche du LÉBHAM (Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologies des Halophytes et des Algues Marines) travaille dans le domaine de la physiologie et de la biochimie des halophytes (plantes vivant en milieu salé) et des algues marines en relation avec leur environnement. Le laboratoire Domaines Océaniques est axé sur la genèse et l'évolution des domaines océaniques. Le Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, axe ses recherches en microbiologie des environnements extrêmes : sources hydrothermales, suintements froids des marges continentales, plancher océanique. Le laboratoire Géomer travaille dans le domaine de la géographie humaine, de la géographie physique et de la géomatique. Le laboratoire Amure s'intéresse à l'analyse économique et juridique des politiques publiques intéressant les activités maritimes et les espaces marins et littoraux.

J'effectue ma thèse au Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR). C'est une Unité Mixte de Recherche UBO/Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)/Institut de Recherches et de Développement (IRD). Le
Nolwenn TRINKLER NCT 2009

Annexes

LEMAR s'appuie sur les compétences de physiciens, chimistes et biologistes pour quantifier et modéliser les **flux de matière biogénique** en milieu marin, et étudier les réponses des **organismes** aux variations de leur **environnement**. Ce laboratoire contribue également à l'**Observatoire** de l'environnement de l'IUEM. La forte **interdisciplinarité** mise en œuvre permet d'aborder un domaine complexe comme les interactions entre les diverses composantes du domaine marin.

L'effectif total du LEMAR comprend **32** chercheurs, **21** ingénieurs/techniciens, **7** post doc, chercheurs Invités, **24** doctorants, répartis dans **5 équipes**.

Le LEMAR est constitué de cinq équipes : chacune d'entre elles est associée à un **thème scientifique** spécifique majeur, mais les interactions et les liens entre les différentes problématiques du laboratoire, associés à son interdisciplinarité, induit de fortes connexions entre les équipes, concrétisées par l'appartenance de la majorité des chercheurs à plusieurs équipes.

Les recherches de l'**équipe 1 « physique et biogéochimie en milieu océanique »** sont axées sur une meilleure compréhension des interactions entre la biogéochimie marine, les processus physiques et les écosystèmes pélagiques. L'ensemble des travaux de recherche de l'**équipe 2 : « écosystèmes côtiers tempérés, tropicaux et polaires, témoins et acteurs des changements globaux »** porte sur le fonctionnement et l'évolution des écosystèmes côtiers sous l'influence des contraintes naturelles et anthropiques.

Je travaille en partie avec l'**équipe 3 « réponse des organismes et des populations à la variabilité environnementale »**, notamment avec **Christine Paillard** ma co-directrice de thèse.

L'objectif de cette équipe est d'étudier de quelle manière et avec quelle intensité, les différents **facteurs environnementaux** contribuent à moduler la réponse des **organismes**. Ces réponses sont analysées à différents **niveaux d'intégration**, à l'échelle moléculaire, cellulaire mais aussi au niveau de l'organisme et de la population. En milieu marin côtier, les **variations des facteurs** climatiques, biotiques et anthropiques sont très marquées. De ce fait, les organismes qui y vivent ont développé des stratégies d'**adaptation** particulières qui leur permettent de maintenir plus ou moins bien leurs fonctions vitales.

Les 3 thèmes développés au sein de cette équipe sont : (1) les **interactions entre espèces** : relation production primaire et physiologie des invertébrés marins, interaction hôte-pathogène, (2) la **réponse aux stress** due aux contaminations chimiques et à l'eutrophisation, et l'**adaptation** d'organismes comme l'huître *Crassostrea gigas*, le flet *Platichthys flesus* et le gastropode *Nucella* et (3) les **approches intégratives** : mécanismes biologiques impliqués dans l'inscription du message environnemental au sein des coquilles d'invertébrés, traits biologiques et bases génétiques chez les invertébrés, bioénergétique des mollusques.

Je travaille en partie dans l'**équipe 4 « Marqueurs de l'environnement et des traits de vie individuels des poissons et des invertébrés marins : approche expérimentale et déconvolution des facteurs métaboliques et environnementaux »**, notamment avec **Maylis Labonne** ma co-directrice de thèse. Cette équipe développe des recherches utilisant les **productions biominérales** (pièces calcifiées internes ou externes) comme **enregistreurs permanents** des **environnements** et de la biologie des organismes. Ces pièces calcifiées offrent un potentiel pour l'identification de marqueurs individuels (ex. : l'âge, la croissance, les migrations), d'indicateurs des populations (structure en âge) et de marqueurs environnementaux (température, salinité...).

Annexes

La démarche de cette équipe se fonde sur l'analyse des mécanismes de **formation des squelettes calcifiés**, et de l'influence directe des facteurs environnementaux ou indirecte de la physiologie des organismes constructeurs suivant 3 axes :

- (1) Mécanismes contrôlant la formation des pièces dures qui servent d'archive calcifiée de l'environnement
- (2) Utilisation des pièces calcifiées pour l'étude des écosystèmes marins actuels et anciens
- (3) Reconstitution des conditions de vie des animaux marins pour une gestion écosystémique des ressources.

L'objectif général de l'équipe 5 « chimie marine » est d'étudier les réactions chimiques et les processus biologiques qui contrôlent la dynamique (disponibilité, spéciation) des éléments bio-limitants dans les systèmes côtiers et océaniques.

2. Situation au regard de la concurrence publique, privée ou internationale

La Maladie de l'Anneau Brun n'est pas étudiée dans beaucoup de laboratoires ce qui réduit fortement la concurrence, d'autant plus que ces laboratoires travaillent généralement en collaboration. En Bretagne, deux équipes travaillent sur la Maladie de l'Anneau Brun, ainsi que une à Paris, deux en Norvège, une en Ecosse et deux aux Etats-Unis (Annexe 1).

3. Compétences scientifiques, techniques et humaines mises à la disposition de mon projet

Au sein du LEMAR, j'avais à ma disposition une **salle d'élevage**, avec des bacs, de l'eau de mer et de l'air sous pression, où je pouvais faire des expériences sur des palourdes vivantes, un **cytomètre de flux** servant à mesurer des paramètres hématocytaires (cellules sanguines des mollusques), une salle spécialisée pour la **culture de bactéries** et un **microscope**. Du point de vu **humain**, je travaillais avec Christine Paillard ma co-directrice de thèse, ainsi qu'avec différents techniciens spécialisés dans le cytomètre de flux, la microbiologie et les salles d'élevage. J'ai également encadré une stagiaire pendant 4 mois.

A l'IRD, j'avais à ma disposition tout le matériel nécessaire pour la préparation des échantillons de **coquilles** pour la WDS microsonde. Du point de vu humain je travaillais avec Maylis Labonne ma co-directrice de thèse, ainsi qu'avec deux techniciens.

A l'UBO, un **Microscope Electronique à Balayage** été mis à ma disposition, ainsi que le technicien responsable de ce microscope.

A l'IFREMER Brest, j'ai profité d'une WDS microsonde, ainsi que du technicien responsable de cette machine.

J'ai également monté des collaborations avec Jean-François Bardeau, un chercheur du **Mans** avec qui j'ai utilisé un spectromètre Raman, ainsi qu'avec Frédéric Marin chercheur et Nathalie Guichard technicienne de **Dijon**, avec qui j'ai pu utiliser des outils biochimiques.

4. Appartenance de l'équipe à un ou à des réseaux scientifiques, socio-économiques, ...

L'IUEM appartient à de nombreux réseaux scientifiques ou sociaux-économiques. Cet institut dépend de différentes tutelles qui sont l'UBO, le CNRS, l'INSU et L'IRD. De plus il a des relations privilégiées avec IFREMER.

L'IUEM est également le siège de réseaux et de grands programmes nationaux et internationaux. En 2007, il existait plus de **200 projets** et programmes dans une **cinquantaine de pays** différents tels que « European Network of excellence for Ocean Ecosystem Analysis (EUR-OCEANS) », « Integrated Marine Biogeochemistry and Ecosystem Research et Science (IMBER) » et « Policy Integration for Coastal System Assessment (SPICOSA) ».

L'École Doctorale des Sciences de la Mer (EDSM) s'appuie sur un réseau d'une **trentaine de départements**, laboratoires ou équipes d'accueil en France, soit un potentiel d'encadrement de plus de **130 chercheurs** habilités à diriger des recherches. Cette école appartient au **réseau MENTOR** composé de nombreux laboratoires européens permettant des collaborations ou des cotutelles dans des laboratoires étrangers lors de thèses. La proximité d'une autre école doctorale sur le **site brestois** ainsi que d'écoles d'ingénieurs réputées (ENST de Bretagne, ENIB) permet la mise en commun des moyens et des enseignements nécessaires à la formation des doctorants.

Le **LEMAR** inscrit également sa démarche dans des grands programmes scientifiques nationaux et internationaux, notamment avec l'équipe 3 et 4. L'**équipe 3** est impliquée dans des programmes spécifiques dont l'**ANR multistress** en collaboration avec l'université de Bordeaux. C'est une étude sur 5 ans visant à évaluer les interactions entre pollutions métalliques, contaminations bactériologiques, et infestations parasitaires (trématodes et protozoaires) sur les réponses génétiques, cellulaires, physiologiques et populationnelles chez la coque *Cerastoderma edule* et la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (2006-2011). Il existe également un **programme** en collaboration avec la région Bretagne pour caractériser des **familles de palourdes résistantes** à la Maladie de l'Anneau Brun (2008-2010), et le **projet VIBRIOSCOPE** en collaboration avec l'Institut Pasteur. Il s'agit de séquencer totalement le génome du *Vibrio tapetis* (2008-2010).

L'équipe 4 est également impliquée dans des programmes dont : l'**ANR OTOCAL (Otolithe Calibration)**. Le thème de ce projet est d'étudier l'otolithe (un os de poisson) comme archive biologique en utilisant une approche mécaniste et de modélisation numérique. C'est une collaboration entre IFREMER Brest, le LEMAR, le laboratoire Reso de l'ENIB, une école d'ingénieurs, et l'équipe *In Virtuo*. Par ailleurs, **EUROCLIMATE PALEOSALT** a pour but de vérifier la validité des proxies de salinité. Les recherches sont menées sur les mêmes sites pour les foraminifères et les bivalves : Westerschelde (Belgique) et Rivière d'Auray (France). Les espèces modèles choisies sont la moule, *Mytilus edulis*, (Westerschelde) et la palourde, *Ruditapes philippinarum* (Rivière d'Auray). En ce qui concerne les foraminifères, les travaux sont menés par le laboratoire BIAF d'Angers (France).

III. Moi dans ce contexte

1. Les raisons de mon choix de faire une thèse et de travailler sur ce sujet

J'ai toujours été attirée par la **biologie marine**. C'est pourquoi depuis le lycée, j'ai fait mes études dans ce domaine ainsi que **6 différents stages** dans le milieu.

Toutes ces expériences m'ont confortée dans le choix de faire de la **recherche en biologie marine**, c'est pourquoi j'ai choisi de faire une **thèse** dans ce domaine.

Par ailleurs, le sujet « La guérison coquillière ; un mécanisme de défense de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* face à la bactérie *Vibrio tapetis* dans le cadre de la Maladie de l'Anneau Brun (MAB) » me permettait d'approfondir mes connaissances sur la **biologie et l'écologie des mollusques**, ainsi que d'acquérir de nouvelles techniques.

2. S'il y a lieu, mon rôle dans la définition et la programmation du projet

Mon sujet de thèse a été défini par **Christine Paillard** et **Marcel Koken**, deux chercheurs CNRS de l'IUEM, quelques mois avant mon arrivée. Ils l'ont ensuite proposé à l'Ecole Doctorale des Sciences de la Mer (EDSM). Puis, j'ai postulé sur ce sujet deux mois avant le début de ma thèse. Au début de ma thèse, Christine Paillard me guidait sur les recherches que je devais mener, et au bout de quelques mois j'ai pris les commandes de ma thèse, notamment en montant des **collaborations** avec **quatre laboratoires** dont un à Dijon et un au Mans.

Déroulement, gestion et coût de mon projet

II. Préparation et cadrage du projet

1. Evaluation des facteurs de succès et de risques, stratégies de maîtrise des risques envisagées

Au départ mon sujet de thèse avait été défini par Marcel Koken et Christine Paillard du LEMAR. A ce niveau l'évaluation des **facteurs de succès et de risques** n'avait pas été pleinement réalisée. Ma **première année** de thèse m'a permis de faire cette évaluation et de me rendre compte premièrement que mon sujet de thèse était **difficilement réalisable** au sein de l'IUEM, par manque de matériel et de savoir-faire. La stratégie de maîtrise ce risque a été de créer des **collaborations** avec d'autres laboratoires localisés à l'IFREMER Brest, et dans les facultés du Maine et de Bourgogne. A cette époque, il y a eu un **changement** dans ma **direction** : Marcel Koken a démissionné de cette direction et Maylis Labonne (IRD) est devenue co-directrice de thèse. J'ai ainsi pu continuer ma recherche afin de résoudre mon sujet de thèse. Deuxièmement, un risque majeur de mon travail de recherche est la **mortalité des palourdes** maintenues en salles d'élevage ou leurs **contaminations** non volontaires par les bactéries présentes notamment dans l'eau de mer courante de l'IUEM. Afin de maîtriser ce risque j'ai du prendre de fortes mesures de précaution et d'**hygiène**, comme javelliser tout le matériel régulièrement, mettre des couvercles et me laver les mains.

2. Choix des partenaires nationaux ou internationaux

Ma thèse a été faite en collaboration entre l'UBO, le CNRS et l'IRD, au sein de l'UMR 6539 du LEMAR à l'IUEM Brest (29). Par ailleurs, durant ma thèse j'ai été amenée à faire des collaborations avec différents laboratoires nationaux n'appartenant pas au LEMAR. J'ai collaboré avec Jean-François Bardeau au Mans (72), de l'université du Maine, dans le **laboratoire LPEC** (Laboratoire de Physique de l'Etat Condensé) afin de pouvoir utiliser le spectromètre Raman sur mes échantillons. J'ai également collaboré avec Frédéric Marin et Nathalie Guichard du **laboratoire de Biogéosciences** de l'université de Bourgogne à Dijon (22), dans le but de faire des analyses biochimiques sur mes coquilles de palourdes, avec notamment l'étude des protéines. Enfin, j'ai collaboré avec Marcel Bohn du **laboratoire microsonde** du centre IFREMER de Brest (29), afin d'utiliser une WDS microsonde.

3. Contribution à la mobilisation de financements externes à l'équipe

Les expériences que j'ai menées dans cadre de ces collaborations avec les facultés du Maine et de Bourgogne ont été financées par ces laboratoires.

4. Aspects contractuels : confidentialité, propriété industrielle et intellectuelle...

Tous mes résultats seront **publiés** dans des **grands journaux scientifiques**, sous forme d'articles en anglais. Jusqu'au jour de ces publications, les résultats ainsi que les méthodes d'expérimentation, sont confidentiels. Mais aucun brevet n'a été fait.

III. Conduite du projet

1. Principales étapes (réunions et leur périodicité, points d'avancement avec mon responsable de thèse, avec mon groupe projet, processus de décision, réorientation éventuelle)

Au cours de ces 3 ans de thèse, j'ai rencontré mes directeurs de thèse Christine Paillard et Maylis Labonne d'une manière assez irrégulière, avec une moyenne d'environ un mois entre deux rendez-vous.

Par ailleurs, notre école doctorale (EDSM) a mis en place des systèmes de comités de thèse. Durant le comité de thèse interne, les avancées ainsi que les éventuels problèmes de la thèse sont discutés avec deux chercheurs du laboratoire sans les directeurs de thèse. Durant le comité de thèse externe les avancées et problèmes éventuels de la thèse sont discutés avec des chercheurs de laboratoires extérieurs ainsi qu'avec le ou les directeurs de thèse.

J'ai fait mon comité de thèse interne, le 7 décembre 2007 et le comité de thèse externe le 4 juin 2008.

Année	2006	2007		2008		2009	
Tâches/ Semestre	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
Bibliographie	[Barre verte continue]						
Injections	[Barre rose]	[Barre rose]	[Barre rose]	[Barre rose]		[Barre rose]	
MEB	[Barre violette]			[Barre violette]	[Barre violette]		
Histologie		[Barre orange]			[Barre orange]	[Barre orange]	
Raman		[Barre magenta]	[Barre magenta]	[Barre magenta]	[Barre magenta]		
Microsonde				[Barre marron]			
Protéines				[Barre violette]		[Barre violette]	
Congrès			[Barre orange]		[Barre orange]	[Barre orange]	[Barre orange]
Publications			[Barre rouge continue]				
Rédaction thèse					[Barre jaune continue]		
Enseignements	[Barre bleue]		[Barre bleue]		[Barre bleue]		

Tableau 1 : Répartition des tâches au cours de la thèse, MEB : Microscope Electronique à Balayage, Raman : micro-spectrométrie Raman.

Les différentes tâches que j'ai effectuées au cours de ma thèse sont réparties assez régulièrement dans le temps, en particulier la bibliographie et les enseignements. Cependant, l'écriture des articles et la participation à des congrès n'ont eu lieu qu'à partir de la 2^{ème} année, de même que l'écriture de la thèse à partir de la 3^{ème} année.

La mise en place des différentes collaborations m'ont permis d'utiliser une microsonde et un spectromètre Raman, ainsi que d'étudier des protéines. Par ailleurs, ces tâches, ainsi que l'utilisation du MEB sont très fragmentées car il a fallu prendre en compte les difficultés liées à la disponibilité des machines.

2. Gestion des relations avec les partenaires scientifiques, socio-économiques, industriels, sous-traitants...

Durant toute ma thèse j'ai eu des contacts réguliers avec mes collaborateurs par mails ou par téléphone. Par ailleurs, j'ai aussi eu des contacts réguliers avec des éleveurs de palourdes ainsi qu'avec une ferme aquacole : la Satmar. C'est une éclosérie, vivant principalement grâce à la production de palourdes japonaises.

3. Problèmes rencontrés et solutions apportées

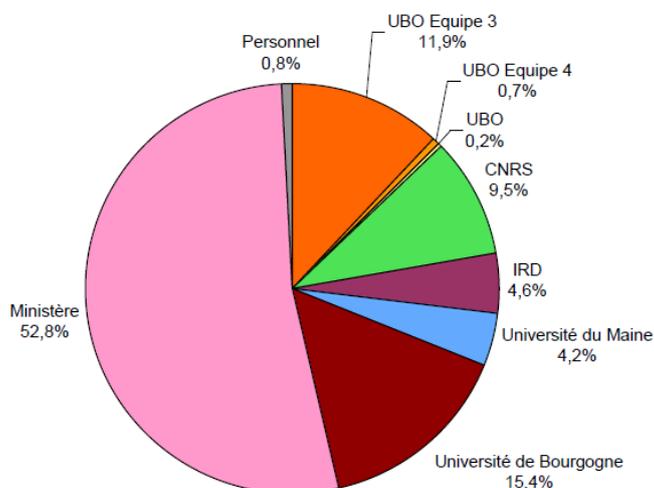
Au début de ma thèse j'étais encadré par Christine Paillard et Marcel Koken. Suite à des conflits entre ces deux chercheurs, j'ai changé de direction. Ainsi, après un an de thèse, j'ai été encadré par Christine Paillard et Maylis Labonne de l'IRD. Ces conflits lors de la première année m'ont éprouvée car ils ont mis ma patience à rude épreuve et m'ont demandé d'avoir une grande diplomatie.

Par ailleurs, l'écriture de mon sujet de thèse était posée d'une telle manière que je ne pouvais pas le résoudre dans mon laboratoire. J'ai donc du chercher des collaborations dans d'autres laboratoires. Ces collaborations m'ont beaucoup apportée d'un point de vue scientifique et technique, mais ce n'est pas une situation toujours très confortable du point de vue de la gestion du temps et financière.

IV. Evaluation et prise en charge du coût de mon projet

Le budget total de ma thèse pour 3 ans s'élève à 103 883 €. Le plus gros investisseur dans ce projet est le ministère de la recherche avec 65 689 € et la plus grosse dépense de ma thèse est le poste des ressources humaines avec 103 883 €.

1. Répartition des financeurs de la thèse

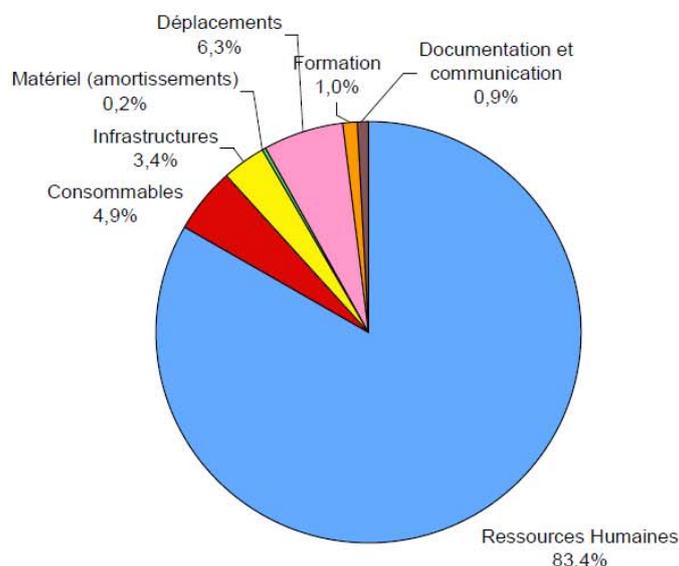


Le ministère de la recherche a financé la majorité du budget de ma thèse avec (65 689 €/124 527 €, Annexe 3). Il s'agit de mon salaire pendant 36 mois. Ensuite, vient l'université de Bourgogne. Ces dépenses sont justifiées par les prestations et l'achat d'anticorps. Ensuite, ma thèse a été financée par les équipes 3 et 4 de l'UBO, le CNRS, l'IRD, l'université de Maine et mes fonds personnels (Annexe 3).

Montants en euros TTC

UBO Equipe 3	UBO Equipe 4	UBO	CNRS	IRD	Université du Maine	Université de Bourgogne	Ministère	Personnel	Total
14777	905	208	11788	5770	5200	19150	65689	1040	124528

2. Coûts de la thèse et leurs répartitions



La plus grande dépense durant ces 3 ans de thèse est celle des **ressources humaines** (103 882 €/124 527 €, Annexe 3). En effet, afin de réaliser mon projet de thèse, j'ai eu un **salaire** pendant 36 mois. Christine Paillard **chargée de recherche** et Maylis Labonne **ingénieur de recherche** ont consacré 3 mois et 1 mois de travail pour ce projet respectivement. De plus, différents **techniciens et assistants ingénieurs**¹ ont travaillé sur mon projet. Par ailleurs trois **secrétaires** Geneviève Cohat, Anne-Sophie Podeur et Annick Toulmont, ont également participé à ce projet. Enfin deux **stagiaires** ont participé à cette recherche sans être financées : Julie Bergeret et Florence Buzin. Une grosse partie des dépenses de ces ressources humaines vient également des **prestations d'analyses**. J'ai en effet réalisé une partie de mon travail de recherche au laboratoire microsonde avec Marcel Bohn à IFREMER Brest, au laboratoire Biogéosciences à Dijon avec Frédéric Marin et Nathalie Guichard, ainsi qu'au laboratoire LPEC au Mans avec Jean-François Bardeau.

Le deuxième poste de dépense est celui des **déplacements**. J'ai fait de nombreux déplacements au Mans et à Dijon, mais aussi à Nice et à San Francisco pour 2 congrès.

Les postes qui viennent ensuite sont les **consommables**, les **infrastructures**, les **formations**, les **documentations** et les **communications**, puis le **matériel** (Annexe 3).

Montants en euros TTC

Ressources Humaines	Consommables	Infrastructures	Matériel (amortissements)	Déplacements	Formation	Documentation et communication	Charges financières (intérêts des emprunts)	Charges exceptionnelles	T
103883	6079	4240	195	7804	1247	1080	0	0	1

¹ Nelly LeGoïc, Adeline Toffin, Christian Tartu, Alain Marhic, Eric Dabas et André Ogor

Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

1. Domaines d'expertise scientifique, sociologique, économique, technique....

1. Domaines d'expertise scientifique

Durant ces 3 ans de thèse j'ai appris à **organiser** un travail de **recherche** dans le but de répondre à une **problématique précise** : la guérison de la palourde japonaise après avoir été affectée par la Maladie de l'Anneau Brun (MAB).

Etude bibliographique

J'ai commencé par faire un état des lieux de des domaines de recherche proches de cette problématique, en faisant une **étude bibliographique précise et complète**. Durant les 3 ans de thèse, j'ai du lire et synthétiser quelques **ouvrages en français** et surtout beaucoup **d'ouvrages et d'articles scientifiques en anglais**. Pour ce faire, j'ai effectué mes recherches à la **Bibliothèque La Pérouse** (IFREMER, UBO, IRD) et sur des sites de **bases de données bibliographiques** que sont Bibliovie (CNRS), Word of Science et AFSA. Je me suis ensuite faite mes propres bases de données bibliographiques à l'aide du **logiciel EndNote**.

Expérimentation

Parallèlement, j'ai effectué mon travail de recherche avec différentes **expérimentations**. Mes premières expérimentations m'ont permis de bien **comprendre** et de bien cerner mon sujet de thèse, afin de me poser les **bonnes questions**. J'ai vu que le mécanisme de résistance de la palourde japonaise était surtout lié à la **réparation coquillière** et je me suis demandée comment se processus ce déroulait. Ensuite j'ai réalisé d'autres expérimentations pour **répondre à ces questions** et pour m'en **poser** d'autres. J'ai su adapter mon travail de recherche en fonction de ces questions, ce qui m'a permis d'utiliser des **techniques** très différentes et variées.

2. Domaines d'expertise sociaux-économiques

Durant toute la durée de mon travail je suis restée en contact avec les différents **acteurs socio-économiques** concernés par ma thématique de recherche et notamment des **éleveurs** de palourdes japonaises ainsi qu'une **ferme d'écloserie** française de palourdes japonaises : la Satmar. Ce fut un **échange très constructif**.

3. Domaines d'expertise techniques

Durant ma thèse j'ai utilisé de nombreuses techniques dans les différents domaines que sont :

La biominéralisation

Méthodes biochimiques : extractions et quantifications de matrices organiques de coquilles de mollusques, électrophorèses SDS Pages, électrophorèses préparatives, tests Elisa, mise au point d'anticorps contre des protéines isolées de matrices organiques coquillières, Western Blots et tests de cristallisation *in vitro* de CaCO₃

Outils physiques : microscope électronique à balayage, WDS microsonde (Wave-length Dispersive Spectrometry ou par dispersion de longueur d'onde) et spectromètre Raman

L'interaction hôte/bactérie

Culture de bactéries, injection de bivalves avec des bactéries, diagnostique de la Maladie de l'Anneau Brun et zootechnie

Annexes

La biologie et la physiologie cellulaire

Cytomètre de flux : comptage total de cellules, mortalité, phagocytose, Espèces Réactives de l'Oxygène

L'histologie

Préparations d'échantillons de tissus et de cellules (fixation, centrifugation sur lame), inclusions de tissus dans la résine et coupes, colorations histochimiques (par exemple Von Kossa)

II. De façon plus large, connaissances acquises...

Dans le champ de la discipline

Tout mon travail de thèse m'a permis d'**approfondir** mes connaissances en **biologie marine** dans les domaines des **pathologies** des animaux marins, mais aussi dans un domaine plus large qui est celui de la **biominéralisation**. Le terme « biominéralisation » signifie tout processus au cours duquel des organismes vivants forment du minéral. Ce domaine comprend aussi bien la formation des os ou des dents que la formation de la craie, par le squelette des organismes microscopiques que sont les coccolithophoridés.

J'ai pu approfondir mes connaissances grâce à mon **travail bibliographique** mais aussi grâce à ma **direction** et aux **collaborations** que j'ai mené avec des laboratoires d'IFREMER Brest, et des facultés du Maine et de Bourgogne et grâce aux **congrès nationaux et internationaux**, où je suis allée.

Dans d'autres domaines

Durant ces 3 années de thèse, j'ai également fait un **monitorat**. C'est-à-dire, j'ai **enseigné** à l'UBO (Université de Bretagne Occidentale), en Travaux Pratiques de la L1 à la L3 en biologie animale et en biologie cellulaire, pendant **288 heures**. Cette expérience m'a appris la capacité à enseigner : la capacité pédagogique, à évaluer un travail et à améliorer mes capacités d'oratrice.

III. Compétences méthodologiques, en conduite de projet, en communication, en négociation

Compétences méthodologiques

Durant ce projet de thèse j'ai pu acquérir des **compétences méthodologiques** notamment grâce l'utilisation de **techniques très variées** en biominéralisation (biochimiques et physiques), en interaction hôte-pathogène, en biologie et physiologie cellulaire et en histologie.

Conduite de projet

Ce travail technique couplé à ma recherche bibliographique m'a permis de réaliser le **projet de recherche** de ma thèse.

Communication

Durant ma thèse, j'ai monté et mené à bien des **collaborations** avec Jean-François Bardeau du Mans (72), Frédéric Marin et Nathalie Guichard de l'université de Bourgogne à Dijon (22), et avec Marcel Bohn du centre IFREMER de Brest (29), à l'aide de la **communication**. J'ai également communiqué avec des **acteurs socio-économiques** que sont les éleveurs de palourdes japonaises ainsi qu'une ferme d'écloserie française de palourdes japonaises : la SATMAR.

Annexes

Enfin, afin de valoriser mes résultats, je les ai communiqués sous formes d'**oraux** ou de **posters** lors de congrès et sous forme d'**articles scientifiques** dans des grandes revues.

Négociation

J'ai également du **communiquer** et **négocier** avec mes **encadrants** pour obtenir des financements et pour faire accepter mes résultats de recherche.

IV. Méthodes de travail, gestion du temps, travail en équipe...

Méthodes de travail

Durant ce travail de recherche de 3 ans, j'ai du travailler avec beaucoup de **rigueur** afin d'être sûre de mes résultats mais aussi afin de ne pas perdre de temps.

Gestion du temps

J'ai dû **organiser** mon **temps de travail** entre mes différents **lieux** de recherches ou d'enseignements (Brest, Plouzané, Dijon, Le Mans) et entre les différentes **techniques** utilisées (biominéralisation : biochimie et physique, interaction hôte-pathogène, biologie et physiologie cellulaire et histologie). Il fallait prendre en compte les **contraintes d'emploi du temps** de chaque personne avec qui je travaillais, ainsi que celles de mes cours et des différents congrès dont les dates ne sont pas flexibles. Malgré tout, j'ai dû également me garder du temps pour l'**exploitation** et la **valorisation** de mes données, pour la **rédaction** des articles scientifiques en anglais, de la **thèse**, ainsi que pour les préparations des **congrès**.

J'ai également encadré une **stagiaire** du DEUST (Diplôme d'Etudes Universitaires Scientifiques et Techniques) de Calais « technicien de la mer et du littoral », Julie Bergeret, durant ma 3^{ème} année de thèse, pendant 4 mois. J'ai dû **gérer** son **emploi du temps** et la **manager**. J'ai dû gérer et organiser mon enseignement en plus de ma recherche, au niveau des heures de cours qui sont souvent inflexibles, mais aussi leurs préparations et les surveillances et corrections d'examens.

Travail en équipe

Enfin, j'ai appris à travailler et m'intégrer dans un certain **nombre d'équipes** dont l'équipe 3 et l'équipe 4 du LEMAR, une équipe du Mans et une équipe de Dijon.

V. Savoir-faire administratifs, organisationnels, linguistiques....

Savoir-faire administratifs

Durant ma thèse, j'ai géré toute l'organisation de mes **déplacements nationaux** et **internationaux** pour des expérimentations ou des congrès. Par ailleurs, j'ai du gérer mon **changement de direction** de thèse auprès de l'administration de l'EDSM. Enfin j'ai géré administrativement l'arrivée de ma **stagiaire**, Julie Bergeret (convention de stage, bureau, financements).

Savoir-faire organisationnels

Par ailleurs, durant ma thèse j'ai su m'**organiser** malgré toutes les **contraintes** scientifiques, techniques et humaines pour réaliser mon projet de thèse et notamment en **organisant mon temps de travail**.

Savoir-faire linguistiques

Annexes

Ma thèse m'a permis d'approfondir mon savoir faire **linguistique**. En effet, j'ai suivi une **formation** d'une semaine en 1^{ère} année de perfectionnement en **anglais**. Par ailleurs, j'ai rédigé 5 **articles scientifiques** en anglais dans des grandes revues scientifiques où les éditeurs sont très rigoureux sur l'anglais et sur le contenu scientifique.

Enfin, j'ai fait des **présentations en anglais** lors de **congrès internationaux**, à Brest (29) et à San Francisco (USA).

VI. Qualités personnelles : créativité, innovation, capacité d'analyse et de synthèse, aptitudes à l'encadrement et à l'animation, rigueur, adaptabilité...

Le test **PerformanSe** m'a permis de mettre en évidence mes **qualités personnelles**. Je suis d'accord avec ces résultats, de même que les personnes qui travaillent avec moi. Je suis très **prudente** : je prends mes précautions afin de ne pas échouer dans ce que j'entreprends et je ne m'engage pas dans des travaux si ils sont **irréalistes** ou par **excès de charge**. Je **mûri mes décisions**, élimine l'influence du hasard et je me méfie des **conseils malveillants**. Je m'attache beaucoup à la **qualité**. Je suis **indépendante** dans mon travail et je préfère réfléchir seule. Je suis **régulière** dans mes efforts. Dans une entreprise j'aurais des atouts notables dans l'**administration** et dans la **conception**, de grandes facilités dans la **production** et dans la **gestion**, et quelques facilités dans l'**encadrement**, l'**argumentation**, la **création** et l'**échange**.

Je suis **rigoureuse** et je **remets en question** plus que je n'affirme. J'ai des motivations de **protection** plus fortes que mes motivations de pouvoir.

VII. Construction d'un réseau professionnel personnel

Les nombreux **stages** que j'ai effectués avant mon travail de thèse m'avaient déjà permis de me construire un **réseau professionnel** personnel, avant mon doctorat.

Ma **thèse** s'est effectuée au **LEMAR**, un laboratoire à cheval sur le **CNRS**, l'**UBO** et l'**IRD**. Ceci m'a permis de bénéficier du réseau professionnel de ces 3 grands instituts de recherche français.

Par ailleurs, mes différentes **collaborations** à l'**IFREMER** Brest, et dans les universités du Maine et de Bourgogne, ont étendu ce réseau professionnel à une **échelle plus grande** que celle d'un seul laboratoire, et m'ont permis de profiter de leurs propres réseaux professionnels.

Enfin, durant ma thèse j'ai participé à de nombreux **workshops** et **congrès** ce qui m'a permis de me tisser un réseau professionnel à une **échelle internationale**.

VIII. Transférabilité de ces compétences en dehors de mon domaine de recherche

Tous les ans, j'ai présenté mes travaux de recherches aux **journées des doctorants du LEMAR**, devant un public très hétéroclite, où je devais vulgariser mon travail.

Par ailleurs, durant ma thèse j'ai présenté un poster et un oral de **vulgarisation scientifique** lors d'une rencontre entre tous les moniteurs du grand-ouest de la France, lors de la **semaine résidentielle du CIES à Rennes**, du 19 au 22 mai 2008.

Annexes

De plus, avec l'aide de Claire Levasseur, une étudiante de l'école des beaux arts de Brest, j'ai réalisé un **court métrage** de 5 minutes appelé « **La palourde et l'anneau brun** ». Ce film a été diffusé de nombreuses fois (Annexe 6).

Résultats, impact de la thèse

I. Pour le laboratoire, les équipes, pour les partenaires du projet, pour la Recherche, l'Economie, la Société...

1. Pour la recherche

Durant ma thèse j'ai pu répondre aux 3 objectifs qui sont :

1. **Comprendre** par quel **mécanisme** les palourdes pourraient **résister** à la MAB. Je sais maintenant que la palourde japonaise peut **résister** à la MAB par un mécanisme de **réparation de la coquille**.
2. **Décrire** ce mécanisme qui est la **réparation coquillère** de la palourde. J'ai étudié en détails ce mécanisme avec différentes méthodes. Je me suis rendue compte que cette couche coquillère de réparation est **très différente** de la coquille d'une palourde non malade.
3. **Créer des outils de sélection** permettant de sélectionner des familles de palourdes résistantes qui guériraient à la maladie. Une étude à une **échelle moléculaire** m'a permis de créer des **outils** qui seront utilisés lors de la sélection de palourdes japonaises résistantes à la MAB.

2. Pour le laboratoire et les équipes

Mon travail de recherche est donc une **avancée** sur la **guérison de la palourde** et sur sa **réparation coquillère** face à la MAB. Cette étude est une avancée pour le LEMAR puisqu'elle donne des indices sur les interactions hôtes-pathogènes (équipe 3) et sur la formation de la coquille (équipe 4).

3. Pour l'économie et la société

C'est une avancée pour les **acteurs socio-économiques** car la sélection de palourdes japonaises résistantes va permettre aux éleveurs de reprendre l'élevage de palourdes japonaises dans le monde, et notamment dans le Finistère.

II. Pour moi-même, en termes d'élargissement des pistes professionnelles identifiées à la lumière de l'analyse de la gestion de ma thèse et de la caractérisation de l'ensemble de mes compétences.

Pour l'an prochain, j'ai demandé et obtenu un **poste d'ATER** d'un an à l'UBO en biologie des organismes. Ultérieurement, je souhaiterais partir en **post doc** en 2010 à l'**étranger**. Pour se faire j'ai pris des contacts lors d'un congrès à San Francisco (USA) en avril 2009, avec des chercheurs d'Allemagne (Potsdam et Dresden), du Danemark (Aarhus university), d'Ecosse (Glasgow) et des Pays Bas (Eindhoven) qui travaillent dans des laboratoires de recherche spécialisés dans la biominéralisation. Les démarches de demandes sont en cours.

Annexe 1

Les laboratoires travaillant sur la Maladie de l'Anneau Brun

En Bretagne une équipe du Laboratoire Universitaire de Microbiologie Appliquée de Quimper, dirigée par Patrick Lechevalier, travaille sur différentes souches de *Vibrio tapetis* dont une isolée chez le bivalve *Dosinia exoleta*. A IFREMER Brest, le Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, dirigé par Jean-Louis Nicolas, s'intéresse à la biologie moléculaire des différentes souches de cette bactérie ainsi qu'à leurs interactions avec la palourde japonaise.

En France, dans l'Institut de génétique et de microbiologie de l'Université de Paris-Sud à Orsay, Annick Jacques et son équipe séquencent le génome de *V. tapetis*.

En Europe, deux équipes norvégiennes dirigées par Stein Mortensen et par Øivind Bergh à l'Institute of Marine Research à Bergen travaillent sur l'avancé de la MAB en Norvège, ainsi que sur l'impact d'une souche de *V. tapetis* sur le poisson *Symphodus melops*. En Ecosse, Harry T. Birkbeck et Helen I. Reid appartiennent à la « Division of Infection and Immunity » de l'Institute of Biomedical and Life Sciences de l'université de Glasgow. Ils travaillent sur l'influence de la salinité sur le développement de la MAB et sur l'influence d'une souche de *V. tapetis* sur le poisson *Hippoglossus hippoglossus*.

Au Etats-Unis, Suzan Ford du Haskin Shellfish Research Laboratory de l'université de Rutgers à Port Norris et Bassem Allam du Marine Sciences Research Center de l'université de Stony Brook, travaillent sur le système immunitaire de la palourde japonaise affectée par la MAB.

Annexe 2

Stages avant la thèse

Au lycée j'ai fait un stage en aquarium à l'océarium du Croisic (44) et un dans le laboratoire de biologie marine au Croisic (44). Par la suite j'ai commencé mes études supérieures à INTECHMER à Cherbourg (50), où j'ai préparé et obtenu un Diplôme de Technicien Supérieur de la Mer (DTSM), avec la spécialisation Génie biologique et productions marines, avec la mention bien, durant lequel j'ai effectué un stage de 5 mois à IFREMER Lorient (56) sur l'impact d'une révision de données sur l'évaluation du stock de morue de mer Celtique (Divisions CIEM VIIe-k), avec Robert Bellail.

Comme je souhaitais continuer à travailler dans la recherche je suis partie à Brest (29) faire une Licence de biologie des organismes, à l'UBO, où j'ai eu la mention bien, ainsi qu'un master 1 Sciences biologiques marines à l'IUEM, où j'ai eu également la mention bien. Durant ces années, j'ai fait un stage de 3 mois sur l'établissement d'une phylogénie des requins d'eaux profondes dans le cadre du projet Halio-authenticité avec Véronique Verrez-Bagnis à IFREMER Nantes, ainsi qu'un stage de 2 mois à Aberdeen au Fisheries Research Services Marine Laboratory, en Ecosse sur l'écologie des requins d'eaux profondes de la Côte Ouest de l'Ecosse, notamment la répartition spatio-temporelle, la distribution des tailles, l'étude des migrations et de la surpêche, avec Doug Beare. Cette dernière expérience m'a également permis d'approfondir mon anglais.

Je suis ensuite partie à Nantes faire un master 2 de Sciences biologiques et médicales, spécialité : Mécanismes et optimisation de la production marine, où j'ai eu la mention assez bien, suite auquel j'ai fait un stage à la station biologique de Roscoff sur des nouvelles familles de produits anti-mitotiques d'origine marine sur la caractérisation de leurs mécanismes d'action cellulaire et moléculaire, avec Laurent Meijer.

Annexe 3 Estimation du cout consolidé de la thèse

NCT		Montants en euros TTC		Coûts totaux (euros TTC)			
Nature de la dépense		Détails *		Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote-part utilisation	Total
1	Ressources Humaines	Salaire brut	Charges				
1.1	Doctorant N. Trinkler	1 824,70 €	729,88 €	36	1 824,70 €		65 689,20 €
1.2	Encadrant 1 C. Paillard	3 700,00 €	1 057,14 €	2	3 700,00 €		7 400,00 €
1.3	Prime Encadrement						0,00 €
1.4	Encadrant 2 M. Labonne	3 700,00 €	1 057,14 €	1	3 700,00 €		3 700,00 €
1.5	Prime Encadrement						0,00 €
1.6	Autre personnel (hors sous-traitance) techniciens	3 431,52 €	485,71 €	1	1 700,00 €		1 700,00 €
1.6	Autre personnel (hors sous-traitance) secrétaires	1 673,00 €	478,00 €	1	1 673,00 €		1 673,00 €
1.7	Sous-traitance (Raman, Protéines, Microsonde)						23 720,40 €
	Sous-total Ressources Humaines						103 882,60 €
2	Consommables						
2.1	Fournitures expérimentales (Cytométrie, salles d'élevage, anticorps)						5 635,70 €
2.2	Fournitures de bureau						443,07 €
2.3	Autres achats						
	Sous-total Consommables						6 078,77 €
3	Infrastructures						
3.1	Entretien, gardiennage, secrétariat						1 000,00 €
3.2	Loyers des locaux	Loyer brut	Charges locatives				3 240,00 €
3.3	Electricité, eau, chauffage, ... (si non inclus dans les charges locatives)						
3.4	Autres						
	Sous-total Infrastructures						4 240,00 €
4	Matériel (amortissements)						
4.1	Matériel d'expérimentation (dont les ordinateurs et logiciels spécialisés)	Taux d'amortissement					
4.2	Ordinateur de bureau	Taux d'amortissement					0,00 €
4.3	Logiciels de bureau (End Note)	Taux d'amortissement					195,00 €
4.4	Autre	Taux d'amortissement					
	Sous-total Matériel						195,00 €
5	Déplacements						
5.1	Missions en France	Transport	Hébergement + autres frais	16,00	340,47 €		5 447,50 €
5.2	Missions à l'étranger	Transport	Hébergement + autres frais	0,00			0,00 €
5.3	Congrès en France	Transport	Hébergement + autres frais	2,00	390,46 €		780,91 €
5.4	Congrès à l'étranger	Transport	Hébergement + autres frais	1,00	1 575,40 €		1 575,40 €
	Sous-total Déplacements						7 803,81 €
6	Formation						
6.1	Formations						207,78 €
6.2	Autres frais (Inscription à l'Université, Sécurité Sociale étudiante, etc.)						1 039,71 €
	Sous-total Formation						1 247,49 €
7	Documentation et communication						
7.1	Affranchissements, Internet, téléphone						1 000,00 €
7.2	Publicité, communication, impressions	Direct	Sous-traitance agence	2,00	40,00 €		80,00 €
7.3	Documentation (périodiques, livres, bases de données, bibliothèque, etc.)						
7.4	Autres						
	Sous-total Documentation et communication						1 080,00 €
8	Charges financières (intérêts des emprunts)						
	Sous-total Charges financières						0,00 €
9	Charges exceptionnelles						
	Sous-total Charges exceptionnelles						0,00 €
10	TOTAL						124 527,67 €

Annexe 4

Les articles rédigés pendant la thèse

2009 **Trinkler N.**, Labonne M., Marin F., Jolivet A., Poulain C., Bardeau J.F., Paillard C. Clam shell repair from the Brown Ring Disease: a study of the organic matrix using Confocal Raman micro-spectrometry and WDS microprobe. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, sous presse.

2009 **Trinkler N.**, Marin F., Guichard N., Labonne M., Bardeau J.F., Paillard C. Shell repair in the clam *Ruditapes philippinarum*, affected by the Brown Ring Disease (BRD): a biochemical and serological study. MRS Spring meeting 2009, San Francisco, 13-17 April 2009, *sous presse*.

2009 **Trinkler N.**, Sinquin G., Querne J., Paillard C. Resistance to Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: A study of selected stocks showing a recovery process by shell repair. *Journal of Invertebrate Pathology, soumise*.

2009 **Trinkler N.**, Guichard N., Labonne M., Plasseraud L., Luquet G., Paillard C., Marin F., Shell repair in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affected by the Brown Ring Disease (BRD), *Marine Ecology Progress Series, In prep.*

2009 **Trinkler N.**, Bardeau J.F., Marin F., Labonne M., Jolivet A., Crassous P., Paillard C. The mineral phase in the shell repair in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affected by the Brown Ring Disease: a Raman micro-spectrometry, SEM and hemocyte cellular study. *Diseases of aquatic organisms Biology, In prep.*

Annexe 5

Les congrès

Du 13 au 17/04/2009, j'ai présenté le poster « **Trinkler N.**, Marin F., Guichard N., Labonne M., Bardeau J.F., Paillard C. Shell recovery process in the clam *Ruditapes philippinarum*, affected by the Brown Ring Disease (BRD): a biochemical study » durant le MRS Spring Meeting 2009, Symposium KK, Structure-property relationships in biomineralized and biomimetic composites, à San Francisco (Etats Unis, Californie).

Du 19 au 21/03/2009 j'ai présenté le poster « **Trinkler N.**, Marin F., Guichard N., Labonne M., Bardeau J.F., Paillard C. Le processus de la guérison coquillière chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*, affectée par la Maladie de l'Anneau Brun (MAB) : une approche biochimique » aux 11^{ème} Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés, Centre Universitaire Européen à Nice (06).

Du 01 au 04/09/2008 j'ai présenté un oral « **Trinkler N.**, Bardeau J.F., Sinquin G., Marin F., Labonne M., Paillard C. Characterization and description of stages of *Ruditapes philippinarum* shell repair face front to the Brown Ring Disease explained with SEM and Raman spectrometry » et un poster « **Trinkler N.**, Labonne M., Poulain C., Bohn M., Paillard C. Ionic mapping of *Ruditapes philippinarum* shells affected by the Brown Ring Disease » durant le congrès Physiomar 08 à l'IFREMER et à l'IUEM de Brest (29).

Enfin les 4 et 5/11/2007 j'ai présenté un oral « **Trinkler N.**, Bardeau J.F., et Paillard C. La maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* : Mécanismes de guérison par réparation coquillière », pendant le workshop proxy carbonatés au LEMAR, Brest (29).

Annexe 6

Diffusion du film « la palourde et l'anneau brun »

Le 22 mars 2007 au colloque « l'Institut Universitaire Européen de la Mer fête ses 10 ans » (Brest) ; du 24 au 26 mai 2007 au 1^{er} festival Rennais du très court-métrage de vulgarisation scientifique (Rennes) ; les 4 et 5 octobre 2007 au Workshop proxy carbonatés LEMAR (Brest) ; le 5 décembre 2007 à la soirée de remise des prix « jeunes chercheurs » au conseil régional de Bretagne (Rennes) ; les 22 et 23 janvier 2008 aux journées des Doctorants du LEMAR (Brest) ; les 31 mai-1^{er} juin, 14-15 juin, et du 14 au 19 août 2008 pendant des stages de danse contemporaine rencontre danse et sciences : ateliers autour du thème « coquillage et milieu marin », Musique et danse en Finistère (Porspoder) ; et le 4 juin 2008 pendant le comité de thèse externe (Brest).

Références bibliographiques

- Abolins-Krogis, A., 1958. The morphological and chemical characteristics of organic crystals in the regenerating shell of *Helix pomatia* L. *Acta Zoologica*. 34, 19-38.
- Abolins-Krogis, A., 1960. The histochemistry of the hepatopancreas of *Helix pomatia* (L.) in relation to the regeneration of the shell. *Arkiv För Zoologi*. 13, 159-201.
- Abolins-Krogis, A., 1963a. The histochemistry of the mantle of *Helix pomatia* (L.) in relation to the repair of the damaged shell. *Arkiv För Zoologi*. serie 2, 15, 461-474.
- Abolins-Krogis, A., 1963b. The morphological and chemical basis of the initiation of calcification in the regenerating shell of *Helix pomatia* (L.). *Acta Universitatis Upsaliensis*. 20, 5-22.
- Abolins-Krogis, A., 1976. Ultrastructural study of the shell-repair membrane in the snail, *Helix pomatia* L. *Cell Tissue Res*. 172, 455-476.
- Abolins-Krogis, A., 1979. *In vitro* recalcification of the demineralized shell-repair membrane of the snail, *Helix pomatia* L. *Cell Tissue Res*. 200, 487-494.
- Addadi, L., Berkovitch-Yellin, Z., Weissbuch, I., Van Mil, J., Shimon, L. J. W., Lahav, M., Leiserowitz, L., 1985. Growth and dissolution of organic crystals with "tailor-made" inhibitors - implications in stereochemistry and materials science. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24, 466-485.
- Addadi, L., Berman, A., Weiner, S., 1991. Intracrystalline proteins from a sea urchin and mollusk: A comparison. In: Suga, S., Nakahara, H., (Eds.), *Mechanisms and phylogeny of Mineralization in biological systems*. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 29-33.
- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., Weiner, S., 2005. Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem. Eur. J.* 12, 980-987.
- Addadi, L., Moradian, J., Shay, E., Maroudas, N. G., Weiner, S., 1987. A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation. Relevance to biomineralization. *Proc. Nalt. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9, 2732-2736.
- Addadi, L., Politi, Y., Nudelman, F., Weiner, S., 2008. Biomineralization design strategies and mechanisms of mineral formation : operating at the edge of instability. In: Novoa, J. J., et al., (Eds.), *Engineering of cristalline materials properties*. Springer, Germany, pp. 1-15.
- Addadi, L., Weiner, S., 1985. Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proc. Nalt. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4110-4114.
- Albeck, S., Addadi, L., Weiner, S., 1996a. Regulation of calcite crystal morphology by intracrystalline acidic proteins and glycoproteins. *Connect. Tissue Res*. 35, 365-370.
- Albeck, S., Weiner, S., Addadi, L., 1996b. Polysaccharides of intracrystalline glycoproteins modulate calcite crystal growth *in vitro*. *Chem. Eur. J.* 2, 278-284.
- 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. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 204.
- Allam, B., Ashton-Alcox, K. A., Ford, S. E., 2001. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes spp.* clams. *Developmental and Comparative Immunology*. 25, 5-6, 365-375.
- 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, 3, 374-383.

Références bibliographiques

- Allam, B., Paillard, C., 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aquat. Org.* 33, 123-128.
- Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 2000a. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 1, 63-69.
- 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, 3, 384-397.
- Allam, B., Paillard, C., Ford, S. E., 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis. Aquat. Org.* 48, 3, 221-231.
- Allam, B., Paillard, C., Howard, A., Le Penec, M., 2000b. Isolation of the pathogen *Vibrio tapetis* and defense parameters in brown ring diseased Manila clams *Ruditapes philippinarum* cultivated in England. *Dis. Aquat. Org.* 41, 2, 105-113.
- Andrews, E. A., 1934. Shell repair by the snail pleurodonte *Rostrata pfr*. *Biol. Bull.* 67, 277-293.
- Anguiano, B. C., Searcy-Bernal, R., Lizarraga, P. M. L., 1998. Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. *Dis. Aquat. Org.* 33, 2, 119-122.
- Armstrong, D. A., Armstrong, J. L., Krassner, S. M., Pauley, G. B., 1971. Experimental wound repair in the black abalone, *Haliotis cracherodii*. *J. Invertebr. Pathol.* 17, 216-227.
- Arnaud-Haond, S., Goyard, E., Vonau, V., Herbaut, C., Prou, J., Saulnier, D., 2007. Pearl formation: persistence of the graft during the entire process of biomineralization. *Mar. Biotechnol.* 9, 1, 113-116.
- Auclair, A. C., Lecuyer, C., Bucher, H., Sheppard, S. M. F., 2004. Carbon and oxygen isotope composition of the *Nautilus macromphalus* : a record of thermocline waters of New Caledonia. *Chem. Geol.* 207, 91-100.
- Auffret, M., 2003. Atlas of histology and cytology of marine molluscs. IFREMER, Brest
- Awramik, S. M., 1992. Early Organic Evolution : Implications for Mineral and Energy Resources. Springer, Berlin, 435-439.
- Ayala, F. J., Rzhetsky, A., Ayala, F. J., 1998. Origin of the metazoan phyla: molecular clocks confirm paleontological estimates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 606-611.
- Balavoine, G., De Rosa, R., Adoutte, A., 2002. Hox clusters and bilaterian phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 24, 366-373.
- Banin, E., Vassilakos, D., Orr, E., Martinez, R. J., Rosenberg, E., 2003. Superoxyde Dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Current Microbiology.* 46, 418-422.
- Bartoli, P., 1974. Recherche sur les Gymnophallidae F. N. Morozov, 1955 (Digenea), parasites d'oiseaux des côtes de Camargue : systématique, biologie et écologie. Thèse de Doctorat. Université d'Aix Marseille, Aix Marseille, pp. 100.
- Bayne, C. J., 1983. Molluscan immunobiology. In: Saleuddin, A. S. M., Wilbur, K. M., (Eds.), *The Mollusca*. Vol. 5, Physiology, Part 2. Academic Press, pp. 407-486.
- Beedham, G. E., 1958. Observations of the non-calcareous component of the shell of the Lamellibranchia. *Quart. J. Micr. Sci.* 99, 341-357.
- Beedham, G. E., 1965. Repair of the shell in species of *Anodonta*. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 145, 107-124.
- Belcher, A. M., Wu, X., Christensen, R., Hansma, P. K., Stucky, G., Morse, D., 1996. Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature.* 381, 56-58.

Références bibliographiques

- Belefield, U., Becker, W., 1991. Embryonic development of the shell of *Biomphalaria glabrata* (Say). *Int. J. Dev. Biol.* 35, 121-131.
- Ben-Haim, Y., Zicherman-Keren, M., Rosenberg, E., 2003. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4236-4242.
- Berman, A., Addadi, L., Weiner, S., 1988. Interactions of sea urchin skeleton macromolecules with growing calcite crystals-a study of intracrystalline proteins. *Nature.* 331, 546-548.
- Bevelander, G., Nakahara, H., 1969a. An electron microscope study of the formation of the ligament of *Mytilus edulis* and *Pinctada radiata*. *Calcif. Tissue Res.* 4, 101-112.
- Bevelander, G., Nakahara, H., 1969b. An electron microscope study of the formation of the nacreous layer in the shell of certain bivalve molluscs. *Calcif. Tissue Res.* 3, 84-92.
- Bevelander, G., Nakahara, H., 1980. Compartment and envelope formation in the process of biological mineralization. In: Omori, M., Watabe, N., (Eds.), *The mechanisms of biomineralization in animals and plants*. Tokai University Press, Tokyo, pp. 19-27.
- Blackwelder, P. L., Watabe, N., 1977. Studies on shell regeneration. II. The fine structure of normal and regenerated shell of the freshwater snail *Pomacea paludosa*. *Biomineralization.* 9, 1-10.
- Blank, S., Arnoldi, M., Khoshnavaz, S., Treccani, L., Kuntz, M., Mann, K., Grathwohl, G., Fritz, M., 2003. The nacre protein perlucin nucleates growth of calcium carbonate crystals. *J. Microsc.* 212, 280-291.
- Boettcher, K. J., Barber, B. J., Singer, J. T., 1999. Use of antibacterial agents To elucidate the etiology of juvenile oyster disease (JOD) in *Crassostrea virginica* and numerical dominance of an alpha-proteobacterium in JOD-affected animals. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 6, 2534-2539.
- Boettcher, K. J., Barber, B. J., Singer, J. T., 2000. Additional evidence that juvenile oyster disease is caused by a member of the *Roseobacter* group and colonization of nonaffected animals by *Stappia stellulata*-like strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 9, 3924-3930.
- Boggild, O. B., 1930a. The shell structure of the mollusks. *Mémoire de l'Académie Royale des sciences et des Lettres de Danemark*, 9 ème série, Copenhague
- Boggild, O. B., 1930b. The shell structure of the mollusks. *K. Dan. Vidensk. Selsk. Skr. Naturvidensk. Math. Afd.* 9, 233-326.
- Bonar, D. B., 1976. Molluscan metamorphosis: A study in tissue transformation. *Am. Zool.* 16, 573-591.
- Borowitzka, M. A., 1982. Morphological and cytological aspects of algal calcification. *Int. Rev. Cytol.* 74, 127-160.
- Borrego, J. J., Castro, D., Luque, A., Paillard, C., Maes, P., Garcia, M. T., 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.
- Bouligand, Y., 1965. Sur une architecture torsadée répandue dans de nombreuses cuticules d'Arthropodes. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 261, 3665-3668.
- Bourne, N., 1982. Distribution, reproduction, and growth of Manila clam, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeves), in British Columbia. *J. Shellfish. Res.* 2, 1, 47-54.
- Bower, S. M., McGladdery, S. E., Price, I. M., 1994. Synopsis of infectious disease and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases.* 4, 1-200.
- Breber, P., 1985. L'introduzione e l'allevamento in Italia dell'arsella del Pacifico, *Tapes semidecussatus* reeve (Bivalvia, Veneridae). *Oebelia.* 11, 153-159.

Références bibliographiques

- Bricelj, V. M., Ford, S. E., Borrero, F. J., Perkins, F. O., Rivara, G., Hillman, R. E., Elson, R. A., Chang, J., 1992. Unexplained mortalities of hatchery-reared, juveniles oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shellfish. Res.* 11, 2, 331-347.
- Brink, D. J., Van Der Berg, N. G., 2005. An investigation of green iridescence on the mollusc *Patella granatina*. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 38, 338-343.
- Broecker, W. S., 1974. *Chemical oceanography*. Harcourt Brace Jovanovich New York
- Brown, B. E., 1982. The form and function of metal-containing "granules" in invertebrate tissues. *Biol. Rev.* 57, 621-667.
- Brown, C. H., 1952. Some structural proteins of *Mytilus edulis*. *Quart. J. Micr. Sci.* 93, 487-502.
- Brusca, R. C., Brusca, G. J., 1990. *Invertebrates*. Sinauer associates Inc., Sunderland, Massachusetts
- Butler, W. T., Bhowm, M., Dimuzio, M. T., Linde, A., 1981. Noncollagenous proteins of dentin. Isolation and partial characterization of rat dentin proteins and proteoglycans using a three-step preparative method. *Coll. Res.* 1, 187-199.
- Byrne, M., 2000. Calcium concretions in interstitial tissues of the Australian freshwater mussel *Hyridella depressa*. In: Harper, E. M., et al., (Eds.), *The evolutionary biology of the bivalvia*. Geological society, special publication 177, London, pp. 329-337.
- Cahn, A. R., 1951. Clam culture in Japan. *Fishery Leaflet. Fish Wildl. Serv. U.S.* 399, 1-103.
- Calvez, I., 2003. Approche de la variabilité spatiale d'une population de palourdes *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), aux stades larvaires et post-larvaires. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 100.
- Cariolou, M. A., Morse, D. E., 1988. Purification and characterization of calcium-binding conchiolin shell peptides from the mollusc, *Haliotis rufescens*, as a function of development. *J. Comp. Physiol. B.* 157, 717-729.
- Carriker, M. R., 1996. The shell and ligament. In: Kennedy, V. S., et al., (Eds.), *The eastern oyster Crassostrea virginica*. College park, Maryland.
- Carter, J. G., 1980. Guide to bivalve shell microstructures. In: Rhoads, D. C., Lutz, R. A., (Eds.), *Skeletal growth of aquatic organisms*. Plenum Press, New York, pp. 645-673.
- Carter, J. G., Clark, G. R., 1985. Classification and phylogenetic significance of molluscan shell microstructure. In: Broadhead, T. W., (Ed.), *Mollusks, notes for a short course*. Univ. of Tennessee Dept. Geol. Sci. Studies in Geology, Tennessee, pp. 50-71.
- Carteret, C., Dandeu, A., Moussaoui, S., Muhr, H., Humbert, B., Plasari, E., 2009. Polymorphism studied by lattice phonon Raman spectroscopy and statistical mixture analysis method. Application to calcium carbonate polymorphs during batch crystallization. *Cryst. Growth Des.* 9, 2, 807-812.
- Caseiro, J., Gauthier, J. P., 1997. L'huître aux lèvres noires, *Pinctada margaritifera*. I. Dommages causés sur le bord des valves - Reconstruction - Evaluation des paramètres de croissance de la nacre coquillière. *Revue de Gemmologie A.F.G.* 130, 7-13.
- Caseiro, J., Gauthier, J. P., 1998. L'huître aux lèvres noires, *Pinctada margaritifera*. II. Altération créée par perçage central de la valve - Comparaison avec les altérations naturelles. *Revue de Gemmologie A.F.G.* 133, 12-16.
- Castro, D., Martinez-Manzanares, E., Luque, A., Fouz, B., Morifigo, M. A., Borrego, J. J., Toranzo, A. E., 1992. Characterization of strains related to brown ring disease outbreaks in southwestern Spain. *Dis. Aquat. Org.* 14, 229-236.
- Cesari, P., Pellizzato, M., 1990. *Tapes philippinarum* : biologia e sperimentazione. Ente di Sviluppo Agricolo Veneto, Ch. *Biologia di Tapes philippinarum*. 21-46.
- Checa, A. G., Okamoto, T., Ramirez, J., 2006. Organization pattern of nacre in Pteriidae (Bivalvia : Mollusca) explained by crystal competition. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 273, 1329-1337.

Références bibliographiques

- Checa, A. G., Rodriguez-Navarro, A. B., 2005. Self-organization of nacre in the shells of *Perioida* (Bivalvia: Mollusca). *Biomater.* 26, 1071-1079.
- Cheng, T. C., 1967. Internal defense mechanisms. *Advances in Marine Biology.* 5, 60-80.
- Choquet, G., 2004. Caractérisation et pathogénie des isolats de *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun chez les palourdes. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 100.
- 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. Org.* 57, 1-2, 109-116.
- Clark, G. R., 1974. Calcification on an unstable substrate: marginal growth in the mollusk *Pecten diegensis*. *Science.* 183, 968-970.
- Clark, G. R., 1976. Shell growth in the marine environment: Approaches to the problem of marginal calcification. *Am. Zool.* 16, 617-626.
- Collip, J. B., 1921. A further study of the respiratory process in *Mya arenaria* and other marine molluscs. *J. Biol. Chem.* 49, 297-310.
- Colwell, R. R., 2004. Infectious disease and environment: cholera as a paradigm for waterborne disease. *International Microbiology.* 7, 4, 285-289.
- Coote, G. E., Trompetter, W. J., 1995. Proton microprobe studies of fluorine distributions in mollusc shells. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B.* 104, 333-338.
- Crenshaw, M. A., 1972a. The inorganic composition of molluscan extrapallial fluid. *Biol. Bull.* 143, 506-512.
- Crenshaw, M. A., 1972b. The soluble matrix of *Mercenaria mercenaria* shell. *Biomaterial. Res. Rep.* 6, 6-11.
- Crenshaw, M. A., 1980. Mechanisms of shell formation and dissolution. In: Rhoads, D. C., Lutz, R. A., (Eds.), *Skeletal growth of aquatic organisms*. Plenum Press, New York, pp. 111-132.
- Crenshaw, M. A., 1982. Mechanism of normal biological mineralization of calcium carbonates. In: Nancollas, G. H., (Ed.), *Biological mineralization and demineralization*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 243-257.
- Crenshaw, M. A., Neff, J. M., 1969. Decalcification at the mantle-shell interface in molluscs. *Am. Zool.* 9, 881-885.
- Crenshaw, M. A., Ristedt, H., 1975. Histochemical and structural study of nautiloid septal nacre. *Biomaterial. Res. Rep.* 8, 1-8.
- Crenshaw, M. A., Ristedt, H., 1976. The histochemical localization of reactive groups in septa nacre from *Nautilus pompilius* L. . In: Watabe, N., Wilbur, K. M., (Eds.), *The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants*. University of South Carolina Press, Columbia, pp. 355-367.
- Cuif, J. P., Dauphin, Y., Flamand, D., Frerotte, B., Gautret, P., 1986. La mesure localisée du taux de soufre comme indicateur de l'origine et de l'état diagenétique des biocristaux carbonatés. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 303, série II, 3, 251-256.
- Dauphin, Y., 2003. Soluble organic matrices of the calcitic prismatic shell layers of two Pteriomorphid bivalves. *Pinna nobilis* and *Pinctada margaritifera*. *J. Biol. Chem.* 278, 17, 15168-15177.
- Dauphin, Y., Cuif, J. P., Doucet, J., Salome, M., Susini, J., Williams, C. T., 2003. *In situ* chemical speciation of sulfur in calcitic biominerals and the simple prism concept. *J. Struct. Biol.* 142, 2, 272-280.
- Dauphin, Y., Williams, C. T., Braskov, I. S., 2007. Aragonitic rostra of the turonian belemnite *Goniocamax*: arguments from diagenesis. *Acta Palaeontol. Pol.* 52, 85-97.
- Davis, G. M., 1964. Shell regeneration in *Oncomelania formasana* (Gasteropoda: Hydrobiidae). *Malacologia.* 2, 1, 145-159.

Références bibliographiques

- De Rosa, R., Grenier, J. K., Andreeva, T., Cook, C. E., Adoutte, A., Akam, M., Carroll, S. B., Balavoine, G., 1999. Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. *Nature*. 399, 772-776.
- Degens, E. T., Spencer, D. W., Parker, R. W., 1967. Paleobiochemistry of molluscan shell proteins. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 20, 553-579.
- DesVoignes, D. M., Sparks, A. K., 1968. The process of wound healing in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 12, 53-65.
- Devauchelle, N., 1990. *Tapes philippinarum* : biologia e sperimentazione. Ente di Sviluppo Agricolo Veneto, Ch. Sexual developement and maturity of *Tapes philippinarum*. 49-62.
- Digby, P. S. B., 1965. Semi-conduction and electrode processes in biological material. I. Crustacea and certain soft-bodied forms. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 161, 504-525.
- Digby, P. S. B., 1968. The mecanism of calcification in the molluscan shell. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 22, 93-107.
- Dillaman, R. M., Saleuddin, A. S. M., Jones, G. M., 1976. Neurosecretion and shell regeneration in *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). *Can. J. Zool.* 54, 1771-1778.
- Diouf, K., Panfili, J., Labonne, M., Aliaume, C., Tomas, J., Do Chi, T., 2006. Effects of salinity on strontium:calcium ratios in the otoliths of the West African black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* in a hypersaline estuary. *Environmental Biology of Fishes*. 77, 9-20.
- Dogterom, A. A., Doderer, A., 1981. A hormone dependent calcium-binding protein in the mantle edge of the freshwater snail *Lymnae stagnalis*. *Calcif. Tissue Int.* 33, 505-508.
- Dogterom, A. A., Jentjens, T., 1980. The effect of the growth hormone of the pond snail *Lymnae stagnalis* on periostracum formation. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 66, 687-690.
- Dogterom, A. A., Loenhout, H., Van Der Schors, R. C., 1979. The effect of growth hormone of *Lymnae stagnalis* on shell calcification. *Gen. Comp. Endocrinol.* 39, 63-68.
- Dorn, R. I., Oberlander, T. M., 1982. Rock varnish. *Prog. Phys. Geogr.* 6, 317-367.
- 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.
- Dugal, L. P., 1939. The use of calcareous shell to buffer the product of anaerobic glycolysis in *Venus mercenaria*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 13, 235-251.
- Dunachie, J. F., 1963. The periostracum of *Mytilus edulis*. *Trans. Roy. Soc. Edinburgh*. 65, 15, 383-411.
- Duplat, D., Puisségur, M., Bedouet, L., Rousseau, M., Boulzaguet, H., Milet, C., Sellos, D., Van Wormhoudt, A., Lopez, E., 2006. Identification of calconectin, a calcium-binding protein specifically expressed by the mantle of *Pinctada margaritifera*. *FEBS Lett.* 580, 2435-2441.
- Duval, A., Bouquillon, A., 2009. La microscopie électronique à balayage. http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/meb.htm#Retour_2.
- Eanes, E. D., 2003. Amorphous calcium phosphated-based bioactive polymeric composites for mineralized tissue. *Journal of Research of the National Institute of Standard and technology*. May 1, 1-5.
- Ehrlich, H. L., 1981. *Geomicrobiology*. Marcel Dekker, New York
- Erben, H. K., Flajs, G., Siehl, A., 1968. Über die Schalenstruktur von Monoplacophoren. *Akad. Wissensch. Litterat. Mainz. Abhandl. Math. Naturwiss. Kl. Jhr.* 1, 3-24.
- Falini, G., Albeck, S., Weiner, S., Addadi, L., 1996. Control of Aragonite or Calcite Polymorphism by Mollusk Shell Macromolecules. *Science*. 271, 67-69.
- Fedonkin, M. A., Waggoner, B. M., 1997. The Late Precambrian fossil *Kimberella* is a mollusc-like bilaterian organism. *Nature*. 388, 868-871.

Références bibliographiques

- Finlay, B. J., Hetherington, N. B., Davinson, W., 1983. Active biological participation in lacustrine barium chemistry. *Geochim. Comochim. Acta.* 47, 1325-1329.
- Flassch, J. P., Barret, J., Mazurie, J., Maes, P., Nicolas, J. L., Noel, T., Paillard, C., Le Pennec, M., 1992. L'élevage de la palourde, programme national de recherche sur la maladie de l'anneau brun. *Les mollusques marins, Biologie et aquaculture, Conference proceedings, Vol. 14.* Ifremer, Brest, pp. 127-140.
- Flassch, J. P., Leborgne, Y., 1992. Introduction in Europe, from 1972 to 1980, of the Japanese manila clam (*Tapes philippinarum*) and effects on aquaculture production and natural settlement. *ICES Marine Symposium, Conference proceedings, Vol. 194.* ICES, Halifax, Canada, pp. 92-96.
- Fleury, C., Marin, F., Marie, B., Luquet, G., Thomas, J., Josse, C., Serpentine, A., Lebel, J. M., 2008. Shell repair process in the green ormer *Haliotis tuberculata*: A histological and microstructural study. *Tissue & Cell.* 40, 3, 207-218.
- 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.
- 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, 2, 378-389.
- Flye Sainte Marie, J., 2007. Approche écophysiological de la Maladie de l'Anneau Brun chez la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* : expérimentations et modélisation. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 144.
- Flye Sainte Marie, J., Jean, F., Paillard, C., Ford, S. E., Powell, E., Hofmann, E., Klinck, J., 2007. Ecophysiological dynamic model of individual growth of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture.* 266, 130-143.
- Flye Sainte Marie, J., Soudant, P., Lambert, C., Le Goïc, N., Goncalvez, M., Travers, M. A., Paillard, C., Jean, F., 2009. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field during an annual cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 377, 1, 1-11.
- Ford, S. E., Borrero, F. J., 2001. Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 78, 3, 141-154.
- Ford, S. E., Paillard, C., 2007. Repeated sampling of individual bivalve mollusks I: Intraindividual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 2, 280-91.
- Fournié, J., Chétail, M., 1982. Accumulation calcique au niveau cellulaire chez les mollusques. *Proceedings of the Seventh International Malacological Congress, Colloque Calcium et Structures Squelettiques. Malacologia.* 22, 265-284.
- Fremy, E., 1855. Recherche chimique sur les os. *Ann. de Chimie.* 43, 47-107.
- Friedman, C. S., Beattie, J. H., Elston, R. A., Hedrick, R. P., 1991. Investigation of the relationship between the presence of a gram-positive bacterial infection and summer mortality of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture.* 94, 1-15.
- Friedman, C. S., Hedrick, R. P., 1991. Pacific Oyster Nocardiosis : Isolation of the Bacterium and induction of Laboratory infections. *J. Invertebr. Pathol.* 57, 109-120.
- Fujikura, K., Okoshi, K., Naganuma, T., 2003. Strontium as a marker for estimation of microscopic growth rates in a bivalve. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 257, 295-301.
- Gabbot, P. A., 1976. Energy metabolism. In: Bayne, B., (Ed.), *Marine Mussels, their Ecology and Physiology.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 294-355.
- Gabbot, P. A., 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In: Hochachka, P., et al., (Eds.), *The Mollusca, Vol 2. Environmental Biochemistry and Physiology.* Academic Press, New York, pp. 165-217.

Références bibliographiques

- Ganagarajah, M., Saleuddin, A. S. M., 1972. Electron histochemistry of the outer mantle epithelium in *Helix pomatia* during shell regeneration. Proc. Malacol. Soc. Lond. 40, 2, 71-77.
- Geraerts, W. P. M., 1976. Control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail *Lymnae stagnalis*. Gen. Comp. Endocrinol. 29, 97-108.
- Gillikin, D. P., Dehairs, F., Lorrain, A., Steenmans, D., Baeyens, W., André, L., 2006. Barium uptake into the shells of the common mussel (*Mytilus edulis*) and the potential for estuarine paleo-chemistry reconstruction. Geochim. Comochim. Acta. 70, 2, 395-407.
- Goarant, C., Herlin, R., Brizard, R., Marteau, A. L., Martin, C., Martin, B., 2000. Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. Dis. Aquat. Org. 40, 2, 101-107.
- Goarant, C., Merien, F., 2006. Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry. Journal of Microbiological Methods. 67, 1, 27-35.
- Goffinet, G., Jeuniaux, C., 1969. Composition chimique de la fraction "nacrine" de la conchioline de nacre de *Nautilus pompilius* Lamarck. Comp. Biochem. Physiol. 29, 277-282.
- Goffinet, G., Jeuniaux, C., 1979. Distribution et importance quantitative de la chitine dans les coquilles de mollusques. Cah. Biol. Mar. 20, 341-349.
- Gordon, J., Carriker, M. R., 1980. Sclerotized protein in the shell matrix of a bivalve mollusc. Mar. Biol. 57, 251-260.
- Gosling, E., 2003. Bivalve Molluscs. Biology, Ecology and Culture. Blackwell Science, Oxford, pp. 200.
- Gotliv, B. A., Addadi, L., Weiner, S., 2003. Mollusk shell acidic proteins: in search of individual functions. Chem. Bio. Chem. 4, 6, 522-529.
- Gouletquer, P., 1989. Etude des facteurs environnementaux intervenant sur la production de la palourde japonaise d'élevage *Ruditapes philippinarum*. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 204.
- Gouletquer, P., 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). FAO Fisheries and Aquaculture Department [online], http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_philippinarum/en.
- Gouletquer, P., Wolowicz, M., 1989. The shell of *Cardium edule*, *Cardium glaucum* and *Ruditapes philippinarum* : Organic content, composition and energy value, as determined by different methods. J. Mar. Biol. Assoc. 132, 563-572.
- Greenaway, P., 1971. Calcium regulation in the freshwater mollusc *Lymnaea stagnalis* (L.) (gasteropoda: Pulmonata). II. Calcium movements between internal calcium compartments. J. Exp. Biol. 54, 609-620.
- Greenberg, E. P., Duboise, M., Palhof, B., 1982. The survival of marine vibrios in *Mercenaria mercenaria*, the hardshell clam. J. Food Safety. 4, 113-123.
- Greenfield, E. M., Wilson, D. C., Crenshaw, M. A., 1984. Ionotropic nucleation of calcium carbonate by molluscan matrix. Am. Zool. 24, 925-932.
- Grégoire, C., 1972. Structure of the molluscan shell. In: Florkin, M., Scheer, B. T., (Eds.), Chemical zoology. Academic Press, New York, pp. 45-102.
- Grégoire, C., Duchateau, G. H., Florkin, M., 1955. La trame protidique des nacres et des perles. Ann. Inst. Oceanogr. Monaco. 31, 1, 1-36.
- Gunn, J. S., Harrowfield, I. R., Proctor, C. H., Thresher, R. E., 1992. Electron probe microanalysis of fish otoliths - evaluation of techniques for studying age and stock discrimination. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 158, 1, 1-36.
- Guzman, N., Ball, A., Cuif, J. P., Dauphin, Y., Denis, A., Ortlieb, L., 2007. Subdaily growth patterns and organo-mineral nanostructure of the growth layers in the calcitic prisms

Références bibliographiques

- of the shell of *Concholepas concholepas* Bruguière, 1789 (Gastropoda, Muricidae). *Microsc. Microanal.* 13, 5, 1-7.
- Haas, W., 1976. Observations on the shell and mantle of the Placophora. In: Watabe, N., Wilbur, K. M., (Eds.), *The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants*. Univ. of South Carolina Press, Columbia, SC, pp. 389-402.
- Haberkorn, H., 2005. Description des paramètres de croissance, de cytotoxicité et des caractéristiques sérologiques et génétiques d'une souche de *Vibrio sp.* thermotolérante. Rapport de master 2, Université de Bretagne Occidentale, Quimper.
- Handler, J. J., Carson, J., Donachie, L., Gabor, L., Taylor, D., 2005. Bacterial Infection in Tasmanian Farmed Abalone: Causes, Pathology, Farm Factors and Control Options. In: Walker, P., et al., (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture*. Fish Health Section.
- Hare, P. E., 1963. Amino acids in the proteins from aragonite and calcite in the shells of *Mytilus californianus*. *Science*. 139, 216-217.
- Hare, P. E., Abelson, P. H., 1965. Amino acid composition of some calcified proteins. *Carnegie Inst. Wash. Year Book*. 64, 223-234.
- Hedegaard, C., Bardeau, J. F., Chateigner, D., 2006. Molluscan shell pigments: an *in situ* resonance Raman study. *Journal of Molluscan studies*. 72, 157-162.
- Helm, M. M., Pelizzato, M., 1990. *Tapes philippinarum* : biologia e sperimentazione. Ente di Sviluppo Agricolo Veneto, Ch. Hatchery, Breeding and Rearing of the *Tapes philippinarum* species. 117-140.
- Hillman, R., 1961. Formation of the periostracum in *Mercenaria mercenaria*. *Science*. 134, 1754-1755.
- Honjo, S., Erez, J., 1978. Dissolution rates of calcium carbonate in the deep ocean: an in-situ experiment in the North Atlantic ocean. *Earth Planet. Sci. Lett.* 40, 287-300.
- Humphreys, J., Caldow, R. W. G., McGroarty, S., West, A. D., Jensen, A. C., 2007. Population dynamics of naturalised Manila clams *Ruditapes philippinarum* in British coastal waters. *Mar. Biol.* 151, 2255-2270.
- Hunt, S., Oates, K., 1970. Fibrous protein ultrastructure of gasteropod periostracum (*Buccinum undatum* L.). *Experientia*. 26, 1196-1197.
- Hunt, S., Oates, K., 1978. Fine structure and molecular organization of the periostracum in a gasteropod mollusc *Buccinum undatum* L. and its relation to similar structural protein systems in other invertebrates. *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B*. 283, 417-463.
- Iwata, K., 1980. Mineralization and architecture of the larval shell of *Haliotis discus hannai* Ino, (Archaeogasteropoda). *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. IV*. 19, 305-320.
- Jacobs, D. K., Soldati, A. L., Wirth, R., Huth, J., Wehrmeister, U., Hofmeister, W., 2008. Nanostructure, composition and mechanisms of bivalve shell growth. *Geochimica et Cosmochimica*. 72, 5401-5415.
- 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. Org.* 53, 1, 25-31.
- Jeuniaux, C., 1963. *Chitine et chitinolyse*. Masson, Paris
- Jing, G., Yan, Z., Li, Y., Xie, L., Zhang, R., 2007. Immunolocalization of an acid phosphatase from pearl oyster (*Pinctada fucata*) and its *in vitro* effects on calcium carbonate crystal formation. *Mar. Biotechnol.* 9, 5, 650-659.
- Jodaikin, A., Traub, W., Weiner, S., 1986. Protein conformation in rat tooth enamel. *Arch. Oral Biol.* 31, 685-689.
- Johnston, M. D., Brown, M. H., 2002. An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and

Références bibliographiques

- studies on their sensitivity to heating and freezing. *Journal of Applied Microbiology*. 92, 6, 1066-1077.
- Jolly, C., Berland, S., Milet, C., Borzeix, C., Lopez, E., Doumenc, D., 2004. Zonal Localization of Shell Matrix Proteins in Mantle of *Haliotis tuberculata* (Mollusca, Gastropoda). *Mar. Biotechnol.* 6, 541–551.
- Jones, D., Wilson, M. J., 1986. Biomineralization in crustose lichens. In: Leadbeater, B. S. C., Riding, R., (Eds.), *Biomineralization in lower plants and animals*. Clarendon Press, Oxford, pp. 91-105.
- Jones, G. G., Sanford, C. L., 1993. *Manila Clams : Hatchery and Nursery Methods*. Innovative Aquaculture Products Ltd.
- Kapur, S. P., Sen Gupta, A., 1970. The role of amoebocytes in the regeneration of shell in the land pulmonate, *Euplecta indica* (Pfieffer). *Biol. Bull.* 139, 502-509.
- Keith, J., Stockwell, S., Ball, D., Remillard, K., Kaplan, D., Thannhauser, T., Sherwood, R., 1993. Comparative analysis of macromolecules in mollusc shells. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 105, 487-496.
- Killian, C. E., Wilt, F. H., 1996. Characterization of the proteins comprising the integral matrix of *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Biol. Chem.* 271, 9150-9159.
- Kirschvink, J. L., Lowenstam, H. A., 1979. Mineralization and magnetism of chiton teeth: paleomagnetic, sedimentologic, and biologic implications of organic magnetite. *Earth Planet. Sci. Lett.* 44, 193-204.
- Klein, R. T., Lohmann, K. C., Thayer, C. W., 1996. Sr/Ca and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in skeletal calcite of *Mytilus trossulus*: Covariation with metabolic rate, salinity, and carbon isotopic composition of seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 60, 21, 4207-4221.
- Kniprath, E., 1972. Formation and structure of the periostracum in *Lymnaea stagnalis*. *Calcif. Tissue Res.* 9, 260-271.
- Kniprath, E., 1978. Growth of the shell-field in *Mytilus* (Bivalvia). *Zool. Scripta.* 7, 119-120.
- Kniprath, E., 1981. Ontogeny of the molluscan shell field. *Zool. Scripta.* 10, 61-79.
- Koene, J. M., Schulenburg, H., 2005. Shooting darts: co-evolution and counter-adaptation in hermaphroditic snails. *BMC Evol. Biol.* 5, 1-13.
- Kono, M., Hayashi, N., Samata, T., 2000. Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 1, 213-218.
- Kontoyannis, C. G., Vagenas, N. V., 2000. Calcium carbonate phase analysis using XRD and FT-Raman spectroscopy. *Analyst.* 125, 251–255.
- Krampitz, G., Drolshagen, H., Hausle, J., Hof-Irmscher, K., 1983a. Organic matrices of mollusc shells. In: Westbroek, P., De Jong, E. W., (Eds.), *Biomineralization and biological metal accumulation*. Reidel, Dordrecht, pp. 231-247.
- Krampitz, G., Drolshagen, H., Hotta, S., 1983b. Simultaneous binding of calcium and bicarbonate by conchiolin of oyster shells. *Experientia.* 39, 1104-1105.
- Kuczumow, A., 2004. Microprobe investigations of patterned natural and petrified biological objects. *J. All. Comp.* 362, 71-82.
- Kumazawa, N. H., Kato, E., Nagawa, Y., 1985. Preliminary analyses on persistence of *Vibrio parahaemolyticus* in a Brackish water clam, *Corbicula japonica*. *Jpn. J. Vet. Sci.* 48, 267-271.
- Kunigelis, S. C., Saleuddin, A. S. M., 1978. Regulation of shell growth in the pulmonate gastropod *Helisoma duryi*. *Can. J. Zool.* 56, 1975-1980.
- Labonne, M., Morize, E., Scolanp, P., Lae, R., Dabas, E., Bohn, M., 2009. Impact of salinity on early life history traits of three estuarine fish species in Senegal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 82, 673-682.
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., Nicolas, J. L., 2006a. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following

Références bibliographiques

- bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect.* 8, 12-13, 2715-2724.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C., Nicolas, J. L., 2006b. 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, 4, 367-79.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S. K., Cueff, A., Gelebart, F., Cordevant, C., Lange, M., Poulet, S. A., 2001a. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis. Aquat. Org.* 46, 2, 139-145.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S. K., Cueff, A., Poulet, S. A., 2001b. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5, 2304-2309.
- Laruelle, F., 1999. Phénologie et déterminisme de la reproduction chez *Ruditapes decussatus* (L.) et *R. philippinarum* (Adams et Reeve) en Bretagne. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 230.
- Laruelle, F., Guillou, J., Paulet, Y., 1994. Reproductive pattern of the clams, *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*, on intertidal flats in Brittany. *J. Mar. Biol. Assoc.* 172, 69-96.
- Latzoura, A., Soladin, J., 2007. Perles une histoire naturelle. MNHN., http://www.mnhn.fr/museum/front/medias/dossPresse/11618_dpperles.pdf.
- Lauckner, G., 1983. Diseases of Mollusca : Bivalvia. In: Kinne, O., (Ed.), Disease of marine animals, pp. 477-1038.
- Le Gros Clark, W. E., 1945. The tissues of the body. Oxford Univ. Press, Oxford
- Le Moullac, G., Le Groumelle, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P., Aquacop, 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology.* 7, 4, 227-234.
- Le Pennec, J. P., 1973. Morphogenesis of the hinge in 5 species of Veneridae. *Malacologia.* 12, 2, 225-245.
- Le Pennec, J. P., 1978. Génèse de la coquille larvaire et postlarvaire chez divers bivalves marins. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 108.
- Le Pennec, M., 1999. Etude relative à la biologie et l'exploitation d'une ressource marine, la palourde japonaise dans le golfe du Morbihan. Programme Promotion des cultures marines. Rapport région Bretagne. pp. 111.
- Lecointre, G., Le Guyader, H., 2001. Classification phylogénétique du vivant. Belin, Paris
- Lécuyer, C., Reynard, B., Martineau, F., 2004. Stable isotope fractionation between mollusc shells and marine waters from Martinique Island. *Chem. Geol.* 213, 293– 305.
- Ledger, P. W., Franc, S., 1978. Calcification of the collagenous axial skeleton of *Veretillum cynomorium* Pall. (Cnidaria: Pennatulacea). *Cell. Tissue Res.* 192, 249-266.
- Lehvaara, I., Kosinen, T., 1985. Vitamin D₃ and 25(OH)D₃ metabolism in the mussel *M. edulis*. *Vitamin D. A chemical, biochemical and clinical update.* De Gruyter, Berlin.
- Lemche, H., Wingstrand, K. G., 1959. The anatomy of *Neopilina galathea* Lemchen, 1957. *Galathea Rpt.* 3, 9-72.
- Levi-Kalishman, Y., Falini, G., Addadi, L., Weiner, S., 2001. Structure of the Nacreous Organic Matrix of a Bivalve Mollusk Shell Examined in the Hydrated State Using Cryo-TEM. *J. Struct. Biol.* 135, 8–17.
- Lindh, U., Mutvei, H., Sunde, T., Westermark, T., 1988. Environmental history told by mussel shells. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B.* 30, 388-392.

Références bibliographiques

- Little, K., 1959. Electron microscope studies on human dental enamel. *J. R. Microsp. Soc.* . 78, 58-66.
- Lopez, C. S., Crosa, J. H., 2007. Characterization of ferric-anguibactin transport in *Vibrio anguillarum*. *Biometals*. 20, 3-4, 393-403.
- Lowenstam, H. A., 1954. Environmental relations of modification compositions of certain carbonate secreting marine invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 40, 39-48.
- Lowenstam, H. A., 1962a. Goethite in radular teeth of recent marine gastropods. *Science*. 137, 279-280.
- Lowenstam, H. A., 1962b. Magnetite in denticle capping in recent chitons (Polyplacophora). *Bull. Geol. Soc. Am.* 13, 435-438.
- Lowenstam, H. A., 1967. Lepidocrocite, an apatite mineral, and magnetite in teeth of chitons (Polyplacophora). *Science*. 156, 1373-1375.
- Lowenstam, H. A., 1968. Weddelite in a marine gastropod and in Antarctic sediments. *Science*. 162, 1129-1130.
- Lowenstam, H. A., 1971. Opal precipitation of marine gastropods (Mollusca). *Science*. 171, 487-490.
- Lowenstam, H. A., 1972. Phosphatic hard tissues of marine invertebrates: their nature and mechanical functions, and some fossil implications. *Chem. Geol.* 9, 153-166.
- Lowenstam, H. A., 1974. Impact of life on chemical and physical processes. In: Goldberg, E., (Ed.), *The sea*. John Wiley, New York.
- Lowenstam, H. A., 1981. Minerals formed by organisms. *Science*. 211, 1126-1131.
- Lowenstam, H. A., Kirschvink, J. L., 1985. Iron biomineralization: a geobiological perspective. In: Kirschvink, J. L., et al., (Eds.), *Magnetite biomineralization and magnetoreception in organisms. A new biomagnetism*. Plenum Press, New York, pp. 3-15.
- Lowenstam, H. A., Margulis, L., 1980. Evolutionary prerequisites for early Phanerozoic calcareous skeletons. *Biosystems*. 12, 27-41.
- Lowenstam, H. A., Rossman, G. R., 1975. Amorphous hydrous, ferric phosphatic dermal granules in *Molpadia* (Holothuroidea): physical and chemical characterization and ecologic implications of the bioinorganic fraction. *Chem. Geol.* 15, 15-51.
- Lowenstam, H. A., Traub, W., Weiner, S., 1984. *Nautilus* hard parts: a study of the mineral and organic constituents. *Paleobiology*. 10, 268-279.
- Lowenstam, H. A., Weiner, S., 1989. *On biomineralization*. Oxford university press, Oxford, pp. 309.
- Lucas, A., 1976. A new type of nursery for rearing bivalve postlarve. Construction, equipment and preliminary results. 10 th Eur. Symp. Mar. Biol. Ostend Sept 17-23 1975. 1, 257-269.
- Lucas, A., 1977. Culture of the Manila Clam (*Venerupis semidedecussata* Reeve) from hatchery-reared spat. *Actes de colloques du CNEXO*. 4, 317-33U.
- Lucas, A., 1993. *Bioénergétique des animaux aquatiques*. Masson, Paris
- Lutz, R. A., Rhoads, D. C., 1977. Anaerobiosis and a theory of growth line formation. *Science*. 198, 1222-1227.
- Lutz, R. A., Rhoads, D. C., 1980. Growth patterns within the molluscan shell: An overview. In: Rhoads, D. C., Lutz, R. A., (Eds.), *Skeletal growth of aquatic organisms*. Plenum Press, New York, pp. 203-254.
- Lyster Jameson, H. M. A., 1902. On the origin of pearl. *Transactions of the Zoological Society of London*. 140-166.
- Ma, Z., Huang, J., Sun, J., Wang, G., Li, C., Xie, L., Zhang, R., 2007. A novel extrapallial fluid protein controls the morphology of nacre lamellae in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *J. Biol. Chem.* 282, 23253-23263.

Références bibliographiques

- Mackenstedt, U., Märkel, K., 1987. Experimental and comparative morphology of radula renewal in pulmonates (Mollusca, Gastropoda). *Zoomorphology*. 107, 209-239.
- Maes, P., 1992. Pathologie bactérienne chez deux invertébrés marins d'intérêt commercial, *Ruditapes philippinarum* et *Paracentrotus lividus*. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 216.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., Iida, T., 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholerae*. *The Lancet*. 361, 9359, 743-749.
- Malek, F. A., Cheng, T. C., 1974. Medical and economic malacology. Academic press Inc, New York, 155-263.
- Maloy, A. P., Ford, S. E., Karney, R. C., Boettcher, K. J., 2007. *Roseovarius crassostreae*, the etiological agent of Juvenile Oyster Disease (now to be known as *Roseovarius* Oyster Disease) in *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*. 269, 71-79.
- 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.
- Mann, S., 1983. Mineralization in biological systems. *Struct. Bonding*. 54, 125-174.
- Mann, S., 1986. Biomineralization in lower plants and animals - chemical perspectives. In: Leadbeater, B. S. C., Riding, R., (Eds.), *Biomineralization in lower plants and animals*. Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 39-54.
- Mann, S., 1988. Molecular recognition in biomineralization. *Nature*. 332, 119-124.
- Mann, S., Perry, C. C., Webb, J., Luke, B., Williams, R. J. P., 1986. Structure, morphology, composition and organisation of biogenic minerals in limpet teeth. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 227, 179-190.
- Mann, S., Perry, C. C., Williams, R. J. P., Fyfe, C. A., Gobbi, G. C., Kennedy, G. J., 1983. The characterization of the nature of silica in biological systems. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 168-170.
- Mao Che, L., Golubic, S., Le Campion-Alsumard, T., Payri, C., 2001. Developmental aspects of biomineralization in the polynesian pearl oyster *Pinctada margaritifera* var. *cumingii*. *Oceanol. Acta*. 24, S37-S49.
- Marie, B., 2008. Evolution des biominéralisations nacrées chez les mollusques : caractérisation moléculaire des matrices coquillères du céphalopode nautiloïde *Nautilus macromphalus* et du bivalve paléohétérodonte *Unio pictorum*. Thèse de Doctorat. Université de Bourgogne, Dijon, pp. 291.
- Marie, B., Luquet, G., Pais De Barros, J. P., Guichard, N., Morel, S., Alcaraz, G., Bollache, L., Marin, F., 2007. The shell matrix of the freshwater mussel *Unio pictorum* (Paleoheterodonta, Unionoida). Involvement of acidic polysaccharides from glycoproteins in nacre mineralization. *FEBS J*. 274, 11, 2933-2945.
- Marin, F., Amons, R., Guichard, N., Stigter, M., Hecker, A., Luquet, G., Layrolle, P., Alcaraz, G., Riondet, C., Westbroek, P., 2005. Caspartin and calprismin, two proteins of the shell calcitic prisms of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis*. *J. Biol. Chem.* 280, 40, 33895-33908.
- Marin, F., Corstjens, P., de Gaulejac, B., de Vrind-De Jong, E., Westbroek, P., 2000. Mucins and molluscan calcification. Molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, pteriomorpha). *J. Biol. Chem.* 275, 27, 20667-20675.
- Marin, F., Dauphin, Y., 1991. Diversité des altérations dans la composition en acides aminés de la phase organique de la nacre des huîtres perlières de Polynésie française

Références bibliographiques

- (*Pinctada margaritifera*) atteintes par l'épizootie. C. R. Acad. Sci. Paris. 312, 3, 483-488.
- Marin, F., Layrolle, P., De Groot, K., Westbroek, P., 2003. The Origin of metazoan skeleton. In: Kobayashi, I., Osawa, H., (Eds.), *Biom mineralization: Formation, Diversity, Evolution and Application*. Tokai University Press, Kanagawa, pp. 50-53.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., Medakovic, D., 2008. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Current topics in developmental biology*. 80, 209-276.
- Marin, F., Smith, M., Isa, Y., Muyzer, G., Westbroek, P., 1996. Skeletal matrices, mucin, and the origin of invertebrate calcification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1554-1559.
- Marsh, M. E., 1986. Biom mineralization in the presence of calcium binding phosphoprotein particles. *J. Exp. Zool.* 239, 207-220.
- Marsh, M. E., Sass, R. L., 1983. Calcium-binding phosphoprotein particles in the extrapallial fluid and innermost shell lamella of clams. *J. Exp. Zool.* 226, 193-203.
- Martinez-Manzanares, E., Egea, F., Castro, D., Morinigo, M. A., Romero, P., Borrego, J. J., 1991. Accumulation and depuration of pathogenic and indicator microorganisms by the bivalve mollusc, *Chamelea gallina* L., under controlled laboratory conditions. *J. Food Protection*. 54, 8, 612-618.
- Martoja, M., 1995. *Mollusques*. Institut Océanographique, Paris
- Marxen, J. C., Becker, W., Finke, D., Hasse, B., Epple, M., 2003. Early mineralization in *Biomphalaria glabrata*: microscopic and structural results. *J. Moll. Stud.* 69, 113-121.
- McConnell, D., 1969. The mineralogy of the apatites and their relation to biologic precipitation. *Proc. North Am. Paleontol. Convention*. 1525-1535.
- McGladdery, S. E., 1999. Shellfish diseases (viral, bacterial and fungal). In: Woo, P. T. K., Bruno, D. W., (Eds.), *Fish diseases and disorders*.
- McNamara, K. J., 1996. Dating the Origin of Animals. *Science*. 274, 5295, 1993 - 1997.
- McNamara, K. J., Awramik, S. M., 1992. Stromatolites: a key to understanding the early evolution of life. *Science Progress*. 76, 345-364.
- Medakovic, D., Popovic, S., Grzeta, B., Plazonic, M., Hrs-Brenko, M., 1997. X-ray diffraction study of calcification processes in embryos and larvae of the brooding oyster *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.* 129, 615-623.
- Meenakshi, V. R., Blackwelder, P. L., Hare, P. E., Wilbur, K. M., Watabe, N., 1975. Studies on shell regeneration. I. Matrix and mineral composition of the normal and regenerated shell of *Pomacea paludosa*. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 50, 2, 347-351.
- Meenakshi, V. R., Blackwelder, P. L., Wilbur, K. M., 1973. An ultrastructural study of shell regeneration in *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia). *J. Zool., Lond.* 171, 475-484.
- Meenakshi, V. R., Donnay, G., Blackwelder, P. L., Wilbur, K. M., 1974a. The influence of substrata on calcification patterns in molluscan shell. *Calcif. Tissue Res.* 15, 31-44.
- Meenakshi, V. R., Hare, P. E., Wilbur, K. M., 1971. Amino acids of the organic matrix of neogastropod shells. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 40, 1037-1043.
- Meenakshi, V. R., Martin, A. W., Wilbur, K. M., 1974b. Shell repair in *Nautilus macromphalus*. *Mar. Biol.* 27, 27-35.
- Milet, C., Berland, S., Lamghari, M., Mouries, L., Jolly, C., Borzeix, S., Doumenc, D., Lopez, E., 2004. General Palaeontology (Palaeobiochemistry) Conservation of signal molecules involved in biom mineralisation control in calcifying matrices of bone and shell. *C. R. Palevol.* 3, 493-501.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., 1996. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oysters pearls. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9657-9660.
- Miyashita, T., Takagi, R., Okushima, M., Nakano, S., Miyamoto, H., Nishikawa, E., Matsushiro, A., 2000. Complementary DNA cloning and characterization of pearlins, a

Références bibliographiques

- new class of matrix protein in the nacreous layer of oyster pearls. *Mar. Biotechnol.* 2, 409-418.
- Moor, B., 1983. Organogenesis. In: Verdonk, N. H., et al., (Eds.), *The Mollusca*, Vol. 3: Development. Academic Press, New York, pp. 123-177.
- Mortensen, S., Strand, O., 2000. Release and recapture of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) introduced to Norway. *Sarsia*. 85, 87-91.
- Mount, A. S., Wheeler, A. P., Paradkar, R. P., Snider, D., 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science*. 304, 5668, 297-300.
- Moura, G., Vilarinho, L., Carvalho Santos, A., Machado, J., 2000. Organic compounds in the extrapallial fluid and haemolymph of *Anodonta cygnea* (L.) with emphasis on the seasonal biomineralization process. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 125, 293-306.
- Muzii, E. O., Catherine, H., Skinner, W., 1966. Calcite deposition during shell repair by the aragonitic gastropod *Murex fulvescens*. *Science*. 151, 201-203.
- Nakahara, H., 1979. An electron microscope study of the growing surface of nacre in two gastropod species *Turbo cornutus* and *Tegula pfefferi*. *Jpn. J. Malac.* 38, 205-211.
- Nakahara, H., 1983. Calcification of gastropod nacre. In: Westbroek, P., De Jong, E. W., (Eds.), *Biomineralization and biological metal accumulation*. Reidel, Dordrecht, pp. 225-230.
- Nakahara, H., Bevelander, G., 1978. The formation of calcium carbonate crystals in *Halimeda incrassata* with special reference to the role of the organic matrix. *Jpn. J. Phycol.* 26, 9-12.
- Nakahara, H., Bevelander, G., Kakei, M., 1982. Electron microscopic and amino acid studies on the outer and inner shell layers of *Haliotis rufescens*. *Venus, Kyoto*. 38, 205-211.
- Nancollas, G. H., 1977. The mechanism of biological mineralization. *J. Crystal. Growth*. 42, 185-193.
- Nassif, N., Pinna, N., Gehrke, N., Antonietti, M., Jaeger, C., Coelfen, H., 2005. Amorphous layer around aragonite platelets in nacre. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 12653-13655.
- Nederbragt, A. J., Van Loon, A. E., Dictus, W. J. A. G., 2002. Expression of *Patella vulgata* orthologs of engrailed and dpp-BMP2/4 in adjacent domains during molluscan shell development suggests a conserved compartment boundary mechanism. *Dev. Biol.* 246, 341-355.
- Neff, J. M., 1972. Ultrastructure of the outer epithelium of the mantle in the clam *Mercenaria mercenaria* in relation to calcification of the shell. *Tissue & Cell*. 4, 591-600.
- Nesson, M. H., 1968. Studies on radula tooth mineralization in the polyplacophora. Thèse de Doctorat. California Institute of technology, Pasadena, California, pp. 100.
- Nesson, M. H., Lowenstam, H. A., 1985. Biomineralization processes of the radula teeth of chitons. In: Kirschvink, J. L., et al., (Eds.), *Magnetite biomineralization and magnetoreception in organisms. A new biomagnetism*. Plenum Press, New York, pp. 333-363.
- Neuman, W. F., Neuman, M. W., 1953. The nature of the mineral phase in bone. *Chem. Rev.* 53, 1-45.
- Ngo, T. T. T., Choi, K.-S., 2004. Seasonal change of *Perkinsus* and *Cercaria* infections in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* from Jeju, Korea. *Aquaculture*. 239, 57-68.
- Nicolas, J. L., Basuyaux, O., Mazurie, J., Thebault, A., 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Org.* 50, 1, 35-43.
- Nishimori, E., Hasegawa, O., Numata, T., Wakabayashi, T., 1998. *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathology*. 33, 495-502.

Références bibliographiques

- Nudelman, F., Gotliv, B. A., Addadi, L., Weiner, S., 2006. Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *J. Struct. Biol.* 153, 2, 176-187.
- Odum, H. T., 1951. Notes on the strontium content of seawater, celestine radialaria and strontianite snail shells. *Science*. 114, 211-213.
- Otake, T., Ishii, T., Ishii, T., Nakahara, M., Nakamura, R., 1997. Changes in otolith strontium:calcium ratios in metamorphosing *Conger myrisaster leptoccephali*. *Mar. Biol.* 128, 562-572.
- Otake, T., Ishii, T., Nakahara, M., Nakamura, R., 1994. Drastic changes in otolith strontium/calcium ratios in leptocephali and glass eels of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 112, 189-193.
- 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.
- Oubella, R., Maes, P., Paillard, C., Auffret, M., 1993. Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.* 15, 193-197.
- Oubella, R., Paillard, C., Maes, P., Auffret, M., 1994. Changes in hemolymph parameters in the manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge. *J. Invertebr. Pathol.* 64, 1, 33-38.
- Paillard, C., 1992. Etiologie et caractérisation de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'élevage, *Ruditapes philippinarum* Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 296.
- Paillard, C., 2004a. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes - pathogènes : développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Habilitation à Diriger les Recherches (HDR). Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 177.
- Paillard, C., 2004b. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Living Resour.* 17, 467-475.
- Paillard, C., Alcox, K., Ford, S. E., 1996. Changes in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the american oyster, *Crassostrea virginica* affected by the Juvenile oyster disease. *Aquat. Living Resour.* 9, 2, 145-158.
- Paillard, C., Allam, B., Oubella, R., 2004a. Effect of temperature on defense parameters in manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* 59, 3, 249-262.
- Paillard, C., Korsnes, K., Le Chevalier, P., Le Boulay, C., Harkestad, L., Eriksen, A. G., Willassen, E., Bergh, Ø., Bovo, C., Skår, C., Mortensen, S., 2008. *Vibrio tapetis*-like strain isolated from introduced Manila clams *Ruditapes philippinarum* showing symptoms of brown ring disease in Norway. *Dis. Aquat. Organ.* 81, 2, 153-161.
- Paillard, C., Le Pennec, M., 1993. Ultrastructural studies of the mantle and the periostracal lamina in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Tissue & Cell.* 25, 2, 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.
- Paillard, C., Maes, P., 1990. Etiology of the brown ring disease in *Tapes philippinarum*: pathogenicity of a *Vibrio sp.* *C. R. Acad. Sci. Paris.* 310, 3, 15-20.
- Paillard, C., Maes, P., 1994. Brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. *Dis. Aquat. Org.* 19, 137-146.
- Paillard, C., Maes, P., 1995a. The brown ring disease in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum* I Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 91-100.

Références bibliographiques

- Paillard, C., Maes, P., 1995b. The brown ring disease in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum* II Microscopic study of the brown ring syndrome. J. Invertebr. Pathol. 65, 101-110.
- Paillard, C., Maes, P., Mazurié, J., Claude, S., Marhic, A., Le Penneç, M., 1997. Epidemiological survey of the brown ring disease in clams of Atlantic coast: role of temperature in variations of prevalence. 8th Symp. Int. Soc. Veterinary Epidemiology and Economics, Conference proceedings, Vol. 31-32. AEEMA, Paris, France, pp. 14031-14033.
- Paillard, C., Maes, P., Oubella, R., 1994. Brown ring disease in clams. Annual Review of Fish Diseases. 4, 219-240.
- Paillard, C., Percelay, L., Le Penneç, M., Le Picard, D., 1989. Origine pathogène de l'"anneau brun" chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, Bivalve). C. R. Acad. Sci. Paris. 309, Série 3, 235-241.
- Palmer, A. R., 1992. Calcification in marine molluscs: how costly is it? Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 1379-1382.
- Parache, A., 1982. La palourde. La Pêche Maritime. 1254, 496-507.
- Park, K.-I., Choi, K.-S., 2004. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for studying of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca : Bivalvia) I. Quantifying eggs. Aquaculture. 241, 667-687.
- Park, K., Paillard, C., Le Chevalier, P., Choi, K. S., 2006. Report on the occurrence of brown ring disease (BRD) in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, on the west coast of Korea. Aquaculture. 255, 1-4, 610-613.
- Pass, D. A., Dybdahl, R., Mannion, M. M., 1987. Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in western Australia. Aquaculture. 65, 149-169.
- Pedroso, H. A., Schwartz, Z., Dean, D. D., Harrison, J. L., Campbell, J. W., Wiederhold, M. L., Boyan, B. D., 1997. Evidence for the involvement of carbonic anhydrase and urea in the calcium carbonate formation in the gravity-sensing organ of *Aplysia californica*. Calcif. Tissue Int. 61, 247-255.
- Peters, W., 1972. Occurrence of chitin in mollusca. Comp. Biochem. Physiol. B. 41, 541-550.
- 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. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest, pp. 160.
- Plana, S., Le Penneç, M., 1991. Altérations de la glande digestive et conséquences nutritionnelles chez la palourde *Ruditapes philippinarum* contaminée par une bactérie du genre *Vibrio*. Aquat. Living Resour. 4, 255-264.
- Plana, S., Sinquin, G., Maes, P., Paillard, C., Le Penneç, M., 1996. Variation in biochemical composition of juvenile *Ruditapes philippinarum* infected by a *Vibrio* sp. Dis. Aquat. Org. 24, 205-213.
- Pokroy, B., Fitch, A. N., Marin, F., Kapon, M., Adir, N., Zolotoyabko, E., 2006. Anisotropic lattice distortions in biogenic calcite induced by intra-crystalline organic molecules. J. Struct. Biol. 155, 1, 96-103.
- Ponurovsky, S. K., 2002. Growth of the bivalve mollusc, *Ruditapes philippinarum* in shallow Waters of Southern Primorye. Conference on Fishery Oceanology, abstract.
- Ponurovsky, S. K., Yakovlev, Y. M., 1992. The reproductive biology of the Japanese littleneck, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeves, 1850) (Bivalvia : Veneridae). J. Shellfish. Res. 11, 2, 265-277.
- Popov, S. V., 1992. Microstructure of shells of some groups of bivalves, pp. 44 , with 8 plates.

Références bibliographiques

- Posner, A. S., Betts, F., 1981. Molecular control of tissue mineralization. In: Veis, A., (Ed.), The chemistry and biology of mineralized connective tissues. Elsevier, Amsterdam, pp. 257-266.
- Poulicek, M., Voss-Foucart, M. F., Jeuniaux, C., 1986. Chitinoproteinc complexes and mineralization in mollusk skeletal structures. In: Muzzarelli, R., et al., (Eds.), Chitin in nature and technology. Plenum Press, New York, pp. 7-12.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., Meldolesi, J., 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 74, 595-636.
- Pronnier, F., 1996. Le développement larvaire et l'alimentation de larves de bivalves d'écolserie. Thèse pour le Diplôme d'état de docteur vétérinaire. Ecole Nationales Vétérinaire de Nantes, Nantes, pp. 100.
- Quayle, D. B., 1951. The rate of growth of *Venerupis pullastra* (Montagu). *Proc. R. Soc. Edinb, Série B.* 64, 4, 384-408.
- Quéro, J.-C., Vayne, J.-J., 1998. Les fruits de la mer et plantes marines des pêches françaises. Delachaux et Niestlé, Lausanne (Suisse), pp. 256.
- Ravera, O., Cenci, R., Beone, G. M., Dants, M., Lodigiani, P., 2003. Trace element concentrations in freshwater mussels and macrophytes as related to those in their environment. *J. Limnol.* 62, 61-70.
- Ravindranath, M. H., Rajeswari Ravindranath, M. H., 1974. The chemical nature of the shell of molluscs: I. Prismatic and nacreous layers of a bivalve *Lamellidans maginalis* (Unionidae). *Acta Histochem.* 48, 26-41.
- Reid, H. I., Duncan, H. I., Laidler, A., Hunter, D., Birkbeck, T. H., 2003a. Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated Atlantic halibut (*Hipoglossus hipoglossus* L.). *Aquaculture.* 221, 65-74.
- Reid, H. I., Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C., Birkbeck, T. H., 2003b. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* 56, 3, 249-258.
- Renugopalakrishnan, V., Uchiyama, A., Horowitz, P. M., Rapaka, R. S., Suzuki, M., Lefteriou, B., Glimcher, M. J., 1986. Preliminary studies of the secondary structure in solution of two phosphoproteins of chicken bone matrix by circular dichroism and Fourier-transform infrared spectroscopy. *Calcif. Tissue Int.* 39, 166-170.
- Renwrantz, L., 1986. Lectins in molluscs and arthropods : their occurrence, origin and role in immunity. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 56, 81-93.
- Reynolds, C. S., 1986. Diatoms and the geochemical cycling of silicon In: Leadbeater, B. S. C., Riding, R., (Eds.), Biomineralization in lower plants and animals. Clarendon Press, Oxford, pp. 269-289.
- Ricken, W., Steuber, T., Freitag, H., Hirschfeld, M., Niedenzu, B., 2003. Recent and historical discharge of a large european river system - oxygen isotopic composition of river water and skeletal aragonite of Unionoidae in the Rhine. *Pal. Pal. Pal.* 193, 73-86.
- Riding, R., 2000. Microbial carbonates: The geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms. *Sedimentology.* 47, 179-214.
- Robert, R., Deltreil, J.-P., 1990. Elevage de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* dans le bassin d'Aracachon. Bilan des dix dernières années et perspectives de développement, Rapport internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER.
- Robert, R., Trut, G., Laborde, J. L., 1993. Growth, reproduction and gross biochemical composition of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in the Bay of Arcachon. France. *Mar. Biol.* 116, 291-299.

Références bibliographiques

- Rousseau, M., Boulzaguët, H., Biagianti, J., Duplat, D., Milet, C., 2007. Low molecular weight molecules of oyster nacre induce mineralization of the MC3T3-E1 cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 487-497.
- Rousseau, M., Lopez, E., Couté, A., Mascarel, G., Smith, D. C., Naslain, R., Bourrat, X., 2005a. Sheet nacre growth mechanism: a Voronoi model. *J. Struct. Biol.* 149, 2, 149-157.
- Rousseau, M., Lopez, E., Stempflié, P., Brendlé, M., Franke, L., Guette, A., Naslain, R., Bourrat, X., 2005b. Multiscale structure of sheet nacre. *Biomaterials*. 26, 6254-6262.
- Rousseau, M., Pereira-Mouriès, L., Almeida, M. J., Milet, C., Lopez, E., 2003. The water-soluble matrix fraction from the nacre of *Pinctada maxima* produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 135, 1-7.
- Runham, N. W., Thornton, P. R., Shaw, D. A., Wayte, R. C., 1969. The mineralization and hardness of the radular teeth of the limpet *Patella vulgata* L. *Z. Zellforsch.* 99, 608-626.
- Runnegar, B., 1964. Crystallography of the foliated calcite shell layers of bivalve molluscs. *Alcheringa*. 8, 273-290.
- Rusenko, K. W., Donachy, J. E., Wheeler, A. P., 1991. Purification and characterization of a shell matrix phosphoprotein from the american oyster. In: Sikes, C. S., Wheeler, A. P., (Eds.), *Surface Reactive Peptides and Polymers, Discovery and Commercialization*. DC, Washington, pp. 107-124.
- Saleuddin, A. S. M., 1967. The histochemistry of the mantle during the early stage of shell repair. *Proc. Malacol. Soc. Lond.* 37, 371-380.
- Saleuddin, A. S. M., 1970. Electron microscopic study of the mantle of normal and regenerating *Helix*. *Can. J. Zool.* 48, 3, 409-416.
- Saleuddin, A. S. M., 1971. Fine structure of normal and regenerated shell of *Helix*. *Can. J. Zool.* 49, 1, 37-41.
- Saleuddin, A. S. M., Petit, H. P., 1983. The mode of formation and the structure of the periostracum. In: Wilbur, K. M., (Ed.), *The mollusca*. Academic Press, New York, pp. 199-234.
- Saleuddin, A. S. M., Wilbur, K. M., 1969. Shell regeneration in *Helix pomatia*. *Can. J. Zool.* 47, 51-53.
- Samata, S. P., Cazaux, C., Hamm, M., Engels, J., Krampitz, G., 1980. Biochemical studies on components of mollusc shells. In: Omori, M., Watabe, N., (Eds.), *The mechanisms of biomineralization in animals and plants*. Tokai Univ. Press, Tokyo, pp. 37-47.
- Santamaria, J. A., Castro, D., Luque, A., Martinez-Manzanares, E., Borrego, J. J., 1995. Histological alterations associated with brown ring disease. International workshop on shell disease in marine invertebrates : environment-host-pathogen interactions, March 29-31, Brest, France.
- Sarashina, I., Endo, K., 1998. Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: implications for calcium carbonate biomineralization. *Am. Mineral.* 83, 1510-1515.
- Sarashina, I., Endo, K., 2001. The complete primary structure of Molluscan Shell Protein 1 (MSP-1), an acidic glycoprotein in the shell matrix of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Mar. Biotechnol.* 3, 362-369.
- Schmidt, W. J., 1924. *Die bausteine des tierkörpers in polarisiertem lichte*. F. Cohen Verlag, Bonn
- Schmidt, W. J., 1959. Bemerkungen zur Schalenstruktur von *Neopilina galathea*. *Galathea Rpt.* 3, 13-17.
- Schonitzer, V., Weiss, I. M., 2007. The structure of mollusc larval shells formed in the presence of the chitine synthase inhibitor Nikkomycin Z. *BMC Struct. Biol.* 7, 1-28.

Références bibliographiques

- Schwabl, M., 1963. Solenogaster mollusks from southern California. *Pacific. Sci.* 17, 261-281.
- Scoffeniels, E., 1951. Utilisation du ^{45}Ca pour l'étude de l'état physicochimique du calcium sanguin échangé au niveau des tissus, chez l'Anodonte. *Arch. Int. Physiol.* 59, 137-138.
- Seibel, B. A., Goffredi, S. K., Thuesen, E. V., Childress, J. J., Robison, B. H., 2004. Ammonium content and buoyancy in midwater cephalopods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 313, 375-387.
- Shapiro, I. M., Boyde, A., 1984. Microdissection - elemental analysis of the mineralizing growth cartilage of the normal and rachitic chick. *Metab. Bone Dis.* 5, 317-326.
- Shen, X., Belcher, A. M., Hansma, P. K., Stucky, G. D., Morse, D. E., 1997. Molecular cloning and characterization of lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. *J. Biol. Chem.* 272, 51, 32472-32481.
- Shimamoto, M., 1986. Shell microstructure of the Veneridae (Bivalvia) and its phylogenetic implications. *Tohoku Univ. Sci. Rep. 2nd ser.* 56, 1, 1-39.
- Silyn-Robert, H., Sharp, R. M., 1986. Crystal growth and the role of the organic network in eggshell biomineralization. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 227, 303-324.
- Simkiss, K., 1965. The organic matrix of the oyster shell. *Comp. Biochem. Physiol.* 16, 427-435.
- Simkiss, K., 1986. The processes of biomineralization in lower plants and animals - an overview. In: Leadbeater, B. S. C., Riding, R., (Eds.), *Biomineralization in lower plants and animals*. Clarendon Press, Oxford, pp. 19-37.
- Simkiss, K., Wilbur, K. M., 1989. *Biomineralization, Cell biology and mineral deposition*. Academic press, San Diego, pp. 327.
- Simpson, J. W., Awapara, J., 1966. The pathway of glucose degradation in some invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 18, 537-548.
- Sinderman, C. J., 1990. *Principal disease of marine fish and shellfish*, Vol. 1. Acad Press, New York and London
- Smith, S. V., 1978. Coral-reef area and the contributions of reefs to processes and resources of the world's oceans. *Nature.* 273, 225-226.
- 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, 137-148.
- 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.
- Sparks, A. K., 1985. *Synopsis of invertebrate pathology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 423.
- Stecher III, H. A., Krantz, D. E., Lord III, C. J., Luther III, G. W., Bock, K. W., 1996. Profiles of strontium and barium in *Mercenaria mercenaria* and *Spisula solidissima* shells. *Geochim. Comochim. Acta.* 60, 18, 3445-3456.
- Stetler-Stevenson, W. S., Veis, A., 1987. Bovine dentin phosphophoryn: calcium ion binding properties of a high molecular weight preparation. *Calcif. Tissue Int.* 40, 97-102.
- Strack, E., 2006. *Pearls*. Rühle-Diebener-Verlag GmbH & Co, KG, Germany, pp. 706.
- Sud, D., Doumenc, D., Lopez, E., Milet, C., 2001. Role of water-soluble matrix fraction, extracted from the nacre of *Pinctada maxima*, in the regulation of cell activity in abalone mantle cell culture (*Haliotis tuberculata*). *Tissue & Cell.* 33, 2, 154-160.
- Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K., Takahashi, T., 1997. Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature.* 387, 6633, 563-564.

Références bibliographiques

- Suzuki, M., Murayama, E., Inoue, H., Ozaki, N., Tohse, H., Kogure, T., Nagasawa, H., 2004. Characterization of prismalin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochem. J.* 382, 205-213.
- Suzuki, S., 1979. Mineralization of the regenerated organic membrane-shell in *Mytilus edulis* (Pelecypoda). 85, 11, 669-677.
- Takesue, R. K., Bacon, C. R., Thompson, J. K., 2008. Influences of organic matter and calcification rate on trace elements in aragonitic estuarine bivalve shells. *Geochim. Comochim. Acta.* 72, 5431-5445.
- Takeuchi, T., Endo, K., 2005. Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Mar. Biotechnol.* 8, 52-61.
- Takeuchi, T., Sarashina, I., Iijima, M., Endo, K., 2008. *In vitro* regulation of CaCO₃ crystal polymorphism by the highly acidic molluscan shell protein Aspein. *FEBS Lett.* 582, 5, 591-596.
- Taylor, J., Strack, E., 2008. Pearl production. In: Southgate, P. C., Lucas, J. S., (Eds.), *The pearl oyster*. Elsevier, Amsterdam, pp. 273-302.
- Taylor, J. D., Kennedy, W. J., Hall, A., 1973. The shell structure and mineralogy of the bivalvia, II Lucinacea- Clavagellacea. Conclusions. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology, London.* 22, 253-294.
- Ter Kuile, B., Erez, J., 1989. Mechanisms for the uptake of inorganic carbon by two species of symbiont-bearing benthonic foraminifera. *Mar. Biol.* 103, 2, 241-251.
- Thompson, F. L., Iida, T., Swings, J., 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiology and molecular biology reviews.* 68, 3, 403-431.
- Timmermans, L. P. M., 1969. Studies on shell formation in molluscs. *Netherl. J. Zool.* 19, 417-523.
- Timmermans, L. P. M., 1973. Mantle activity following shell injury in the pond snail *Lymnaea stagnalis* L. *Malacologia.* 14, 53-61.
- Tompa, A., 1974. A comparative study of the ultrastructure and mineralogy of calcified land snail eggs. *J. Morph.* 150, 661-688.
- Tracy, R. P., Stenner, D. D., Romberg, R. W., Mintz, K. P., Riggs, B. L., Mann, K. G., 1987. In: Sen, A., Thornhill, T., (Eds.), *Development and diseases of cartilage bone matrix*. Liss, A. R., New York, pp. 127-136.
- Treccani, L., Mann, K., Heinemann, F., Fritz, M., 2006. Perlwapin, an abalone nacre protein with three four-disulfide core (whey acidic protein) domains, inhibits the growth of calcium carbonate crystals. *Biophys. J.* 91, 7, 2601-2608.
- Tzeng, W. N., Sevenin, K. P., Wickström, H., 1997. Use of otolith microchemistry to investigate the environmental history of European eel *Anguilla anguilla*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 149, 73-81.
- Uozumi, S., Suzuki, S., 1979. "Organic membrane-shell" and initial calcification in shell regeneration. *Jour. Fac. Sci., Hokkaido Univ., Ser. IV.* 19, 1-2, 37-74.
- Urmos, J., Sharma, S. K., Mackenzie, F. T., 1991. Characterization of some biogenic carbonates with Raman spectroscopy. *Am. Mineral.* 76, 641-646.
- Von Graff, L., 1875. Anatomie des *Chaetoderma nitidulum*. *Z. Wissensch. Zool.* 26, 166-192.
- Voronkov, M. G., Zelchan, G. I., Lukevitz, E., 1975. *Silizium und Leben*. Akademie-Verlag, Berlin
- Wada, K., 1961. Crystal growth of molluscan shells. *Bull. Nat. Pearl. Res. Lab.* 7, 703-785.
- Wada, K., 1980. Initiation of mineralization in bivalve molluscs. In: Omori, M., Watabe, N., (Eds.), *The mechanisms of mineralization in animals and plants*. Tokai university press, Tokyo, pp. 79-92.

Références bibliographiques

- Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J. L., Marissal, E., Berthe, F., 2002. Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. C. R. Biol. 325, 3, 231-238.
- Wagge, L. E., 1951. The activity of amoebocytes and of alkaline phosphatases during the regeneration of the shell in the snail, *Helix aspersa*. J. Cell Science. 3-92, 307-321.
- Wagge, L. E., 1952. Quantitative studies of calcium metabolism in *Helix aspersa*. J. Exp. Zool. 120, 311-342.
- Waite, J. H., 1983. Quinone-tanned scleroproteins. In: Wilbur, K. M., (Ed.), The mollusca. Academic Press, New York, pp. 467-504.
- Waite, J. H., Saleuddin, A. S. M., Anderson, S. O., 1979. Periostracin - a soluble precursor of sclerotized periostracum in *Mytilus edulis* L. J. Comp. Physiol. 130, 301-307.
- Waller, T. R., 1980. Scanning electron microscopy of shell and mantle in the order Arcoida (Mollusca: Bivalvia). Smithsonian Contrib. Biol. 313, 1-58.
- Wang, X., Liu, B., Xiang, J., 2009. Cloning, characterization and expression of ferritin subunit from clam *Meretrix meretrix* in different larval stages. Comp. Biochem. Physiol. B. 154, 1, 12-16.
- Watabe, N., 1965. Studies on shell formation. XI. Crystal-matrix relationships in the inner layers of mollusk shells. J. Ultrastruct. Res. 12, 351-370.
- Watabe, N., 1984. Shell. In: Bereiter-Hahn, J., Matolsky, A. G., (Eds.), Biology of the Integument. Springer-Verlag, Berlin, pp. 448-485.
- Watabe, N., Blackwelder, P. L., 1980. Ultrastructure and calcium localization in the mantle epithelium of the freshwater gastropod *Pomacia paludosa* during shell regeneration. In: Omori, M., Watabe, N., (Eds.), The mechanisms of biomineralisation in animals and plants. Tokai University Press, Tokyo, pp. 131-144.
- Weiner, S., 1979. Aspartic Acid-rich proteins: Major components of the soluble organic matrix of mollusk shells. Calcif. Tissue Int. 29, 163-167.
- Weiner, S., 1986. Organization of extracellularly mineralised tissues: a comparative study of biological crystal growth. CRC Crit. Rev. Biochem. 20, 365-408.
- Weiner, S., Hood, L., 1975. Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells: a potential template for shell formation. Science. 190, 987-989.
- Weiner, S., Talmon, Y., Traub, W., 1983a. Electron diffraction of mollusk shell organic matrices and their relationship to the mineral phase. Int. J. Biol. Macromol. 5, 325-328.
- Weiner, S., Traub, W., 1980. X-ray diffraction study of the insoluble organic matrix of mollusk shells. FEBS Lett. 111, 311-316.
- Weiner, S., Traub, W., 1981. Organic-matrix-mineral relationships in mollusk shell nacreous layers. In: Balaban, M., et al., (Eds.), Structural aspects of recognition and assembly in biological macromolecules. Balaban ISS, Rehovot, Philadelphia, pp. 467-482.
- Weiner, S., Traub, W., 1984. Macromolecules in mollusc shells and their functions in biomineralization. Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B. 304, 421-438.
- Weiner, S., Traub, W., Lowenstam, H. A., 1983b. Organic matrix in calcified exoskeletons. In: Westbroek, P., De Jong, E. W., (Eds.), Biomineralization and biological metal accumulation. Reidel, Dordrecht, pp. 205-224.
- Weiss, I. M., Göhring, W., Fritz, M., Mann, K., 2001. Perlustrin, a *Haliotis laevigata* (abalone) nacre protein, is homologous to the insulin-like growth factor binding protein N-terminal module of vertebrates. Biochem. Biophys. Res. Commun. 285, 244-249.
- Weiss, I. M., Kaufmann, S., Mann, K., Fritz, M., 2000. Purification and characterization of Perlucin and Perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 267, 17-21.

Références bibliographiques

- Weiss, I. M., Tuross, N., Addadi, L., Weiner, S., 2002. Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *J. Exp. Zool.* 293, 5, 478-491.
- Wheeler, A. P., George, J. W., Evans, C. A., 1981. Control of CaCO₃ nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. *Science.* 212, 1397-1398.
- Whitfield, M., Watson, A. J., 1983. The influence of biomineralization on the composition of seawater. In: Westbroek, P., De Jong, E. W., (Eds.), *Biomineralization and metal accumulation.* Reidel, Dordrecht, pp. 57-72.
- Wilbur, K. M., 1964. Shell formation and regeneration. In: Wilbur, K. M., Yonge, C. M., (Eds.), *Physiology of mollusca.* Academic press, New York, pp. 243-282.
- Wilbur, K. M., 1984. Many minerals, several phyla, and few considerations. *Am. Zool.* 24, 839-845.
- Wilbur, K. M., Colinvaux, L. H., Watabe, N., 1969. Electron microscope study of calcification in the alga *Halimeda* (order Siphonales). *Phycologia.* 8, 27-35.
- Wilbur, K. M., Jodrey, L. H., 1952. Studies on shell formation. I. Measurement of the rate of shell formation using Ca⁴⁵. *Biol. Bull.* 103, 269-276.
- Wilbur, K. M., Jodrey, L. H., 1955. Studies on shell formation. V. The inhibition of shell formation by carbonic anhydrase inhibitors. *Biol. Bull.* 108, 359-369.
- Wilbur, K. M., Saleuddin, A. S. M., 1983. Shell formation. In: Saleuddin, A. S. M., Wilbur, K. M., (Eds.), *The mollusca.* Academic Press, New York, pp. 235-287.
- Wise, S. W., 1970. Microarchitecture and mode of formation of nacre (mother-of-pearl) in pelecypods, gastropods and cephalopods. *Eclogae Geol.* 63, 775-797.
- Withnall, R., Chowdhry, B. Z., Silver, J., Edwards, H. G., de Oliveira, L. F. C., 2003. Raman spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochimica Acta Part A.* 59, 10, 2207-2212.
- Wong, V., Saleuddin, A. S. M., 1972. Fine structure of normal and regenerated shell of *Helisoma duryi duryi*. *Can. J. Zool.* 50, 1563-1568.
- Woodland, W., 1907. Studies in spicule formation. VI. *Quart. J. Microsc. Sci.* 51, 45-53.
- Worms, D., Weiner, S., 1986. Mollusk shell organic matrix: Fourier Transform Infrared study of the acidic macromolecules. *J. Exp. Zool.* 237, 11-20.
- Wray, G. A., Levinton, J. S., Sapiro, L. H., 1996. Molecular evidence for deep precambrian divergences among metazoan phyla. *Science.* 274, 568-573.
- Yan, Z., Jing, G., Gong, N., Li, C., Zhou, Y., Xie, L., Zhang, R., 2007. N40, a novel nonacidic matrix protein from pearl oyster nacre, facilitates nucleation of aragonite *in vitro*. *Biomacromolecules.* 8, 11, 3597-3601.
- Yap, W. G., 1977. Population biology of the Japanese little-neck clam, *Tapes philippinarum* in Keneohe Bay, Hawaiian Islands. *Pacific Science.* 31, 223-244.
- Yin, Y., Huang, J., Paine, M. L., Reinhold, V. N., Chasteen, D., 2005. Structural characterization of the major extrapallial fluid protein of the mollusc *Mytilus edulis* : implication for function. *Biochemistry.* 44, 10720- 10731.
- Zhang, G., Xie, X., Wang, Y., 2001. Raman spectra of nacre from shells of main pearl-culturing mollusk in China. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi.* 21, 2, 193-196.
- Zylstra, U., Boer, H. H., Sminia, T., 1978. Ultrastructure, histology and innervation of the mantle edge of the freshwater pulmonate snails *Lymnaea stagnalis* and *Biomphalaria pfeifferi*. *Calcif. Tissue Res.* 26, 271-282.