



HAL
open science

Les phénoloxydases chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : biomarqueurs potentiels de stress environnemental

Andrea Luna Acosta

► **To cite this version:**

Andrea Luna Acosta. Les phénoloxydases chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : biomarqueurs potentiels de stress environnemental. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2010. Français. NNT : 2010LAROS313 . tel-00567216

HAL Id: tel-00567216

<https://theses.hal.science/tel-00567216>

Submitted on 18 Feb 2011

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.



UNIVERSITE DE LA ROCHELLE

ECOLE DOCTORALE

Sciences pour l'Environnement Gay Lussac

UMR 6250 CNRS

Laboratoire Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs)



THÈSE

présentée par :

Andrea LUNA ACOSTA

Soutenue le 06 décembre 2010

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : OCEANOLOGIE BIOLOGIQUE ET ENVIRONNEMENT MARIN

LES PHENOXYDASES CHEZ L'HUITRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS* : BIOMARQUEURS POTENTIELS DE STRESS ENVIRONNEMENTAL

Composition du jury :

Claude AMIARD-TRIQUET

Claire HELLIO

Pierre MIRAMAND

Philippe DUBOIS

Tristan RENAULT

Paco BUSTAMANTE

Hélène THOMAS-GUYON

Ingrid FRUITIER-ARNAUDIN

Directeur de recherche CNRS, Université de Nantes

Senior Lecturer, University of Portsmouth (UK)

Professeur, Université de La Rochelle

Professeur, Université Libre de Bruxelles (Belgique)

Cadre de Recherche III, IFREMER La Tremblade

Professeur, Université de La Rochelle

Maître de conférences, Université de La Rochelle

Maître de conférences, Université de La Rochelle

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Encadrant scientifique

Encadrant scientifique

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du Jury de thèse pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie le Conseil Général de la Charente-Maritime pour le financement de cette thèse, ainsi qu'à la région Poitou-Charentes et à l'Agence Nationale de La Recherche pour le financement de différents projets auxquels j'ai pu participer.

Je remercie également à Sylvain Lamare et à Gérard Blanchard pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire LIENSs et de l'Université de La Rochelle.

Merci à mon directeur de thèse Paco Bustamante pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe AMARE et pour ses conseils précieux, notamment sur la rigueur scientifique et le pragmatisme.

Merci à Ingrid Fruitier-Arnaudin pour m'avoir appris les techniques indispensables à la réalisation des analyses biochimiques et m'avoir accueilli au sein de l'équipe MAB pendant une grande partie de ma thèse.

Un merci très spécial à Hélène Thomas-Guyon pour son soutien, pour les bons moments passés ensemble, pour me montrer les 1001 façon qui peuvent exister pour arriver à atteindre ses objectifs, pour ses encouragements et ses conseils et surtout pour son positivisme et sa bonne humeur.

Un grand merci à Eric Rosenfeld pour son aide à la compréhension du vaste monde des phénoloxydases et des mécanismes d'oxydo-réduction, pour le temps passé à essayer de comprendre la bibliographie avec moi et pour toutes les discussions sur 'phénoloxydases ou pas phénoloxydases, telle est la question'.

Merci à Cyrille Barthélémy pour m'avoir appris les différentes techniques en biologie moléculaire et son encadrement scientifique au début de ma thèse.

Merci à Denis Fichet pour m'avoir permis de participer au projet POLERON et pour m'avoir aidé dans l'obtention d'huîtres dans le cadre de la problématique *in situ*.

Merci à Robert Galois pour son expertise et conseils sur les dosages des lipides et du glycogène.

Merci à Christel Lefrançois, Marion Richard, Hans Hartmann et surtout à Pierre-Guy Sauriau pour votre aide précieuse en statistiques.

Un grand merci à Philippe Pineau, Michel Prineau, Dominique Vilday, Nicolas Lachaussé, Vanessa Becquet, Françoise Mornet, Thierry Guyot, Stéphane Récoura, Pascal Tiphaneau et surtout à Valérie Huet pour toute votre aide et votre soutien technique.

Au LERPC, Ifremer de La Tremblade, merci à Jean-Michel Chabirand, Olivier Courtois, Jean-Louis Gaignon, Stéphane Guesdon et Patrick Soletchnik pour le prêt du valvomètre.

Et un grand merci à Ismaël Bernard pour m'avoir aidé, appris et conseillé sur l'utilisation de ce dernier et pour avoir partagé avec moi sa passion sur l'ostréiculture et sur nos amies les huîtres !

A l'Ifremer-INRA de l'Houmeau, merci à Marie-Laure Bégout, Xavier Cousin et Didier Leguay, pour le prêt de matériel et pour votre accueil au sein de vos installations.

Merci également à Christine Dupuy et Christel Lefrançois pour le matériel prêté pour les expériences en mésocosme.

Et merci à Margot De Crignis pour tous ses conseils sur le monde du biofilm et pour m'avoir appris à faire de belles 'soupes' de vase... 'surtout n'oublies pas de bien mélanger'!

A La Tremblade, un grand merci à Tristan Renault, Denis Saulnier, Nicole Faury, Philippe Haffner et Raphaël Brizard pour avoir participé à la réalisation des expériences de contamination aux herbicides et aux molécules pharmaceutiques, pour m'avoir appris les techniques de cytométrie de flux et de PCRq et pour les nombreuses discussions autour de la problématique des mortalités estivales, les maladies infectieuses et les contaminants à 7h du mat', à 10h, à midi, à 14h, à 17h, à 19h vivent les cinétiques !

A Brest, merci à Gilbert Le Lann, François-Xavier Merlin et surtout à Stéphane LeFloch et Rami Kanan au Cedre, à Claire Quentel et Anne Bado-Nilles à l'AFFSA et à Michaël Théron à l'UBO pour votre aide, soutien et conseils lors de la réalisation des expériences d'exposition aux hydrocarbures.

Au LPTC de Bordeaux, merci à Hélène Budzinski, Karyn Le Menach et Nathalie Tapié pour m'avoir appris les techniques en chimie organique analytique, ainsi que pour les analyses qui ont pu être réalisées sur les huîtres. Je remercie également à Jean-François Narbonne et Christel Clérendeau pour nos discussions si intéressantes sur l'interprétation des résultats obtenus dans les expériences *in situ*.

Merci à Marion Richard et Thomas Milinkovitch pour toute votre aide et vos conseils sur les expériences de contamination aux hydrocarbures et pour toutes les discussions autour du thème des biomarqueurs, et bien sûre aussi pour les bonnes soirées passées ensemble.

Merci à Elodie Kérambrun, Cyril André, Stéphanie Daubat, Marion Menguy, Mylène Pommier, Myriam Amari, Joachim Godefroy, Kévin de Freytas, Jérémy Laheux, Maxime Pelmoine, Marion Caille et Fanny Caupos pour toute votre aide, votre motivation et pour avoir participé avec moi dans cette grande aventure !!!

A mes collègues de bureau à Marie-Curie et à ILE : à Vanessa Hamme et Delphine Féron pour m'avoir montré tout à mon arrivé au laboratoire et m'avoir accueilli aussi bien dans votre bureau, à Nicolas Bridiau pour tous ses conseils en enzymologie et surtout sur la rédaction de la thèse, à Thomas Milinkovitch et Jeremy Kiszka pour les bons moments passés ensemble et nos profonds questionnements sur pourquoi word ne veut pas marché ou pourquoi l'ordi ne s'allume pas, pourquoi on ne peut pas imprimer et puis, pourquoi aimer les poneys, les requins et les baleines, pourquoi tous ces étrangers avec des noms bizarres viennent envahir la France et bien d'autres questions essentielles et existentielles !

Aux doctorants de Marie-Curie et surtout à Zsuzsanna Marton, Emmanuel Deau, Hervé Rouillard, Virginie Pasquet, Mickaël Langumier, Guillaume Pierre, Nicolas Joguet et à tous les stagiaires de Marie-Curie et aux doctorants de l'ILE et surtout à Benoît Lebreton, Christel Lefrançois, Serena Como, Fabrizio Atzori (et oui ! je vous inclus dans le groupe des doctorants ;)), Marcella Cannas et Tarek Daouk pour tous les super bons moments passés ensemble au laboratoire et en dehors du laboratoire !!! Merci aussi aux filles pour les soirées DDMR et pour toute la vie que vous amené au labo.

Et un grand merci également à tous ceux qui m'ont amené, ramené et re-amené au labo, surtout en plein hiver (spéciale dédicace à Manu) !

Je remercie aussi tout le personnel administratif du laboratoire Laetitia Darre, Patricia Caillat-Miousse, Viviane Biou, Marie Chivaille pour toute votre aide au cours de ces trois années de thèse. Merci à Brigitte Hudelaine et Jennifer de La Corte-Gomez de l'Ecole Doctorale Gay Lussac pour votre bonne humeur et pour faire paraître les tâches administratives comme quelque chose de simple et de réalisable.

Merci au département de Biologie et surtout à Pascale Garcia, Florence Caurant, Hélène Montanié et Christine Trichet pour tous vos conseils en enseignement. Merci à Armelle Combaud pour m'encourager à faire de la vulgarisation scientifique et m'avoir permis de participer dans différentes activités du laboratoire à cet effet.

Merci à Frédérique Deloffre-Vye et à mon 'coach' Pierre Peigné pour me montrer un autre aspect de la thèse dans le cadre du Nouveau Chapitre de Thèse.

A tous les membres du laboratoire LIENSs pour le prêt de matériel, les conseils techniques et scientifiques, mais aussi pour les pauses cafés, les repas du labo et de façon générale pour la super bonne ambiance !

Aux moniteurs promotion 2007-2010 : Aurélie Godon, Thomas Gouriou, Emmanuel Deau, Matéo Lugiez, Benjamin, Guillaume Démarcq, Guillaume Pierre, Arnaud Deflou, Matthieu Lugiez, Sloven Dubois, Antoine Dumon et Nazir Alsayed, pour les bons moments passés ensemble, pour tout nos échanges sur le recadrage, sur la première expérience en enseignement et tous les échanges autour de nos thèses si différentes et en même temps si similaires ! Un grand merci aussi à Jean-Christophe Moine et à Séverine Roly pour toute cette énergie positive que vous m'avez transmise lors de nos rencontres et pour m'avoir montré une vision complètement différente de la science.

Je remercie aussi à tous mes amis, en France, en Colombie et aux quatre coins du monde qui sont passés à La Rochelle pour me faire un 'tit coucou pendant ces 3 années et à tous ceux qui ont suivi de près ou à distance l'évolution de ma thèse.

Et puis, pendant la phase de rédaction, un grand merci à tous les gens qui m'ont accompagné, chouchouté et conseillé à Toulouse, à Bordeaux et à La Rochelle.

Merci aussi à Nescafé, Café Malongo, Café marque Carrefour, Café Amor Perfecto, Café Juan Valdez parce que sans vous je n'aurais pas réussi cette thèse !!!

A ma famille Verrouil-Tressol en France, un grand merci pour tous vos conseils et vos encouragements, pour tout votre soutien et votre amour, et surtout pour m'avoir inclus de façon si chaleureuse dans votre famille.

A mi familia Luna-Acosta-De Mendoza en Colombia, mil gracias a todos mis tíos y primos por consentirme tanto, por su buen humor y sus sabios consejos, y sobre todo, por todos los buenos momentos que me han brindado.

A mi abuelita, por ser la persona que eres, porque como tú solo hay una ! por todo tu amor, tus consejos de cocina, tus historias y anécdotas y sobre todo por toda tu energía y tu gran sentido del humor.

A mis papás, por todos los esfuerzos que han hecho para permitirme realizar mis sueños, por siempre darme ánimos para seguir adelante y realizar lo que me propongo, por enseñarme que en la vida todo se puede, y sobre todo porque, a pesar de la distancia, siempre han estado ahí para apoyarme y quererme.

A Antoine pour tout ton amour, tes encouragements, ta patience, ton intérêt porté sur l'huître et ses phénoloxydases, ça y est! Maintenant tu es aussi tout un spécialiste dans le domaine!!! Merci pour tous tes conseils et surtout pour être toujours à mes côtés, à me faire rire et m'apprendre à profiter des choses simples de la vie.

A todos ustedes, mil gracias por todo !!!!!

Publications présentées dans ce manuscrit :

1. **Luna-Acosta A**, Rosenfeld E, Amari M, Fruitier-Arnaudin I, Bustamante P, Thomas-Guyon H (2010) First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology* 28:719-726
 2. **Luna-Acosta A**, Thomas-Guyon H, Amari M, Rosenfeld E, Bustamante P, Fruitier-Arnaudin I (Soumis) Characterization of tissue-specific phenoloxidase activities in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*
 3. **Luna-Acosta A**, Saulnier D, Pommier M, Haffner P, De Decker S, Renault T, Thomas-Guyon H (Soumis) First evidence of a potential antibacterial activity involving the phenoloxidase system in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*
 4. **Luna-Acosta A**, Thomas-Guyon H, Faury N, Saulnier D, Fruitier-Arnaudin I, Bustamante P, Renault T. (En préparation) Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofene) on immunological parameters of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, spat
 5. **Luna-Acosta A**, Kanan R, LeFloch S, Huet V, Pineau P, Bustamante P, Thomas-Guyon H. (En préparation) Use of chemical dispersant in coastal and estuarine areas: potential immunotoxic effects of chemically dispersed oil in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, juveniles
 6. Richard M, **Luna-Acosta A**, Prineau M, Huet V, Caupos, F, Thomas-Guyon H. (En préparation) Influence of contaminated mudflat with dispersed oil on defence mechanisms of oyster (*Crassostrea gigas*): an intertidal mesocosm experiment
 7. **Luna-Acosta A**, Bustamante P, Godefroy J, Fruitier-Arnaudin I, Thomas-Guyon H (2010) Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed *in situ*. *Environmental Science and Pollution Research*. 17:999-1008
 8. **Luna-Acosta A**, Bustamante P, Budzinski H, Huet V, Thomas-Guyon H (En préparation) Biological effects of persistent organic pollutants in juveniles of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* : a transplantation study in the French Atlantic Coast
-

Publications non présentées dans ce manuscrit :

9. Lacoue-Labarthe T, Bustamante P, Hörlin E, **Luna-Acosta A**, Bado-Nilles A, Thomas-Guyon H (2009) Phenoloxidase activation in the embryo of the common cuttlefish *Sepia officinalis* and responses to Ag and Cu exposure. *Fish and Shellfish Immunology*. 27:516-521
10. **Luna-Acosta A**, Lefrançois C, Millot S, Chatain B, Bégout ML (Soumis) Physiological response in different strains of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): swimming and aerobic metabolic capacities. *Aquaculture*
11. **Luna-Acosta A**, Kanan R, LeFloch S, Pineau P, Bustamante P, Thomas-Guyon H. (En préparation) A comparative study of the effect of chemically dispersed oil on lysosomal membrane stability and phenoloxidase activity in two marine bivalves
12. Kerambrun E, Rosenfeld E, **Luna-Acosta A**, Thomas-Guyon H. (En préparation) H₂O₂ production in haemocytes of *Crassostrea gigas* exposed *in vitro* to environmentally relevant concentrations of Benzo(a)pyrene

Communications orales :

Luna-Acosta A, Le Floch S, Menguy M, Thomas-Guyon H (2009) Effect of a mixture hydrocarbon-chemical dispersant on immune defenses of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Congrès des Jeunes Océanographes par l'Union des Océanographes de France*, La Rochelle, France - *Prix du Jury en communication orale*

Luna-Acosta A, Rosenfeld E, LeFloch S, Fruitier-Arnaudin I, Thomas-Guyon H (2009) What type of phenoloxidase-like activity is present in *Crassostrea gigas*? Thorough identification of a pertinent biomarker of contaminant effect. *IMMUNINV Congrès Immunité des Invertébrés*, Poitiers, France

Luna-Acosta A, Amari M, Fruitier-Arnaudin I, Bustamante P, Thomas-Guyon H (2009) Localisation and characterization of phenoloxidase-like activity in *Crassostrea gigas*. *ESBM, European Society of Marine Biotechnology*, Concarneau, France

Luna-Acosta A, Thomas-Guyon H, Pommier M, Renault T, Saulnier D (2009) Phenoloxidase bactericidal effect in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *SEB Society of Experimental Biology Congress*, Glasgow, Scotland

Luna-Acosta A, Godefroy J, Bustamante P, Rosenfeld E, Fruitier-Arnaudin I, Thomas-Guyon H (2009) Biomarkers of interest to assess in situ the impact of pollutants on immune defenses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PRIMO 15th International Symposium on pollutant responses in Marine Organisms Congress*, Bordeaux, France

Communications affichées:

Richard M, Milinkovitch T, **Luna-Acosta A**, Godefroy J, Caupos F, Thomas-Guyon H (2010) Influence of contaminated mudflat with dispersed oil on the health of golden grey mullet (*Liza aurata*): Preliminary in mesocosm experiment. *Fish Biology Congress*, Barcelone, Espagne

Luna-Acosta A, Godegroy J, Bustamante P, Rosenfeld E, Fruitier-Arnaudin I, Thomas-Guyon H (2009) *In situ* study in the estuarine bay of Marennes-Oleron: the use of biomarkers to assess the impact of pollutants on immune defense mechanisms in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PRIMO 15th International Symposium on pollutant responses in Marine Organisms Congress*, Bordeaux, France

Luna-Acosta A, Rosenfeld E, Fruitier-Arnaudin I, Bustamante P, Thomas-Guyon H (2009) Towards a better understanding of a pertinent biomarker of contaminant effect on *Crassostrea gigas*: the prophenoloxidase system. *ASLO (American Society of Limnology and Oceanography) Aquatic Science Meeting*, Nice, France

Luna-Acosta A, Le Floch S, Menguy M, Thomas-Guyon H (2009) Biological effects of a mixture of hydrocarbon - chemical dispersant in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the blue mussel *Mytilus edulis*. *36th Aquatic Toxicology Workshop*, Québec, Canada

Luna-Acosta A, Fruitier-Arnaudin I, Barthélémy C, Bustamante P, Thomas-Guyon H (2008) Identification of molecular immune related biomarker in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *SEB Society of Experimental Biology Congress*, Marseille, France

Lefrançois C, **Luna-Acosta A**, Millot S, Péan S, Bégout ML, Domenici P (2008) Swimming performance and aerobic metabolic scope in domesticated strains of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *International Congress on the Biology of Fish*, Portland, USA

Activités d'enseignement :

2010-2011

ATER au Département de Biologie

Attaché temporaire d'Enseignement et de Recherche

Université de La Rochelle, France

Volume horaire : 96h équivalent TD

Niveau : Licence / Master

2007-2010

Monitorat au Département de Biologie

Université de La Rochelle, France

Volume horaire : 192h équivalent TD

Niveau : Licence / Master

Intitulé des UE :

Découverte de l'environnement terrestre

Introduction à la biologie végétale

Biologie et écologie végétale

Biologie moléculaire

Génétique moléculaire et techniques biologiques

Expérimentation en laboratoire

Microorganismes

Qualité des Eaux

Génétique microbienne

Génétique du développement

Biologie des vertébrés

Biologie et écologie des vertébrés marins

Biologie et écologie marine générales

Ecologie marine

Immunologie (Département de Biotechnologies)

Ichtyologie

Grandes Fonctions

Ecophysiologie

Sigles et abréviations

2-ME	2-mercaptoéthanol
4-HR	4-hexylrésorcinol
AChE	Acétylcholinestérase
CaCl₂	Chlorure de calcium
CAT	Catalase
CE	Carboxylestérase
CTAB	Bromure de céthyltriméthylammonium
DCE	Directive Cadre Eau
DDT	Dithiothréitol
DETC	Diéthylthiocarbamate
EST	Etiquette d'une séquence exprimée
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
GPx	Glutathion peroxydase
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HLS	Surnageant de lysat hématocytaire
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
LPS	Lipopolysaccharides
MDA	Malondialdéhyde
MgCl₂	Chlorure de magnésium
MXDM	Mécanisme de défense multixenobiotique
NaCl	Chlorure de sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	Oxyde nitreux
OCP	Pesticides organochlorés
OsHV-1	Ostreid Herpesvirus type 1
PAMP	Motifs moléculaires associés aux agents pathogènes
PBDE	Polybromodiphényléthers
PCB	Polychlorobiphényles
PCRq	Réaction en chaîne par polymérase en temps réel
PO	Phénoloxydases
PPD	p-phénylènediamine
PPSP	Produits pharmaceutiques et de soins personnels
proPO	pro-Phénoloxydase
PRP	Protéines reconnaissant des motifs
PTU	1-phényl-2-thiourée
ROCCH	Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du littoral
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SDS	sodium dodécyl sulfate
SOD	Superoxyde dismutase

SSH	Hybridation suppressive soustractive
TBT	Tributylétain
TPCK	N-tosyl-L-phénylalanil chlorométhyl k�tone
Tris HCl	Hydrochlorure de tris(hydroxyméthyl)aminométhane
US EPA	Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis

Avant-propos

1. Contexte de l'étude

Ce travail est réalisé dans le cadre d'une étude sur l'interaction entre l'huître creuse *Crassostrea gigas* au stade juvénile et les contaminants organiques présents dans le milieu naturel. L'huître creuse, *C. gigas* (Thunberg 1753), est le produit aquacole le plus commercialisé dans le monde (FAO 2010) et le bassin de Marennes-Oléron, région où ces travaux ont été principalement réalisés, est le premier site de production d'huîtres creuses en France (Soletchnik *et al.* 1999). Cependant, de fortes mortalités de *C. gigas* ont lieu chaque été et affectent plus particulièrement les jeunes stades (juvéniles). Ces mortalités sembleraient être dues à un déséquilibre entre les acteurs de la triade hôte – pathogène – environnement. Ce déséquilibre provoquerait une diminution des capacités de défense chez l'hôte et favoriserait l'apparition et/ou l'augmentation des maladies jusqu'à la mort de l'individu (Samain 2007). Parmi les facteurs environnementaux susceptibles de provoquer ce déséquilibre, différentes études ont montré que les contaminants organiques pouvaient affecter les capacités de défense, en particulier immunitaire, chez divers organismes aquatiques (Galloway & Depledge 2001).

2. Problématique

Parmi les enzymes impliquées dans les mécanismes de défense immunitaire chez les mollusques bivalves marins et susceptibles d'être modulées par la présence de contaminants dans le milieu, mon travail s'est focalisé sur les phénoloxydases (PO). Les PO sont les enzymes clés de la mélanisation, présentes chez la majorité des êtres vivants, y compris chez l'Homme. Récemment, une activité de type PO a été identifiée dans l'hémolymphe de *C. gigas* (Luna-González *et al.* 2003, Hellio *et al.* 2007) et a été proposée comme biomarqueur potentiel de contamination (Bado-Nilles 2008). Les PO regroupent trois types d'enzymes (tyrosinase, catécholase et laccase). Cependant, malgré le fait que les contaminants pourraient moduler de façon différentielle ces trois catégories d'enzymes, en fonction de leur activité, leur localisation cellulaire ou tissulaire et/ou leur

rôle dans les mécanismes de défense chez *C. gigas*, aucune étude n'a été réalisée, à notre connaissance, dans cette optique. Ainsi, une plus ample connaissance et une meilleure compréhension de ces différents aspects, faciliteraient, et rendraient plus pertinente, l'évaluation des PO chez *C. gigas* comme biomarqueurs potentiels de stress environnemental.

3. Objectifs

Ainsi, les objectifs de ma thèse ont été les suivants:

- 1) Identifier les activités PO dans différents tissus de l'huître, et leur implication potentielle dans les mécanismes de défense immunitaire ;
- 2) Evaluer le potentiel des PO comme biomarqueurs par des expériences d'exposition à des contaminants organiques dans des conditions contrôlées de laboratoire ;
- 3) Evaluer le potentiel des PO comme biomarqueurs par des études de transplantation et de biosurveillance *in situ*.

4. Stratégie de l'étude

Dans le but d'atteindre notre premier objectif, nous avons réalisé une étude bibliographique approfondie sur les PO et sur les différentes méthodes utilisées pour doser ces enzymes chez les bivalves, dans l'idée, dans un premier temps, de proposer un protocole de dosage optimisé pour mesurer l'activité de ces enzymes. Ensuite, en utilisant différents substrats et inhibiteurs des PO, nous avons cherché à identifier les activités PO présentes dans l'hémolymphe (i.e., plasma et hémocytes) et d'autres tissus de *C. gigas* (i.e., branchies, glande digestive, manteau, muscle). Nous avons voulu étudier par la suite le rôle potentiel de ces activités PO dans les mécanismes de défense immunitaire de *C. gigas*, en réalisant des études de croissance bactérienne *in vitro*. Pour cela, nous avons mis deux souches bactériennes pathogènes de l'huître, *Vibrio splendidus* et *V. aesturianus*, communément détectées lors des épisodes de mortalité estivale des huîtres, en présence des différents tissus de *C. gigas* (avec ou sans des substrats et inhibiteurs des PO).

Afin d'accomplir notre second objectif, nous avons étudié l'effet de différents contaminants organiques (herbicides et hydrocarbures, principalement) sur les activités PO détectées dans les différents tissus et compartiments hémolymphatiques précédemment identifiés. L'ensemble de ces analyses ont été faites en réalisant une étude comparative avec la réponse d'autres activités enzymatiques impliquées dans les mécanismes de défense de *C. gigas* : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), et le lysozyme.

Dans le but de réaliser notre troisième objectif, nous avons étudié la modulation des activités PO dans les différents tissus et compartiments hémolymphatiques précédemment identifiées sur des huîtres ayant été transplantées sur différents sites de la côte Atlantique française, pendant des périodes successives de trois mois, et ce à différentes saisons. Les variations saisonnières des PO et leur relation avec la teneur en contaminants, i.e., les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB), les polybromodiphényléthers (PBDE), les pesticides organochlorés (OCP), présents dans les huîtres ont été analysés.

5. Organisation du manuscrit

Durant ma thèse, j'ai rédigé différents articles scientifiques (2 sont publiés, 2 actuellement soumis, 4 en préparation pour soumission) pour publication dans différents journaux internationaux à comité de lecture. De cette façon, j'ai cherché à répondre de façon régulière à une question donnée (dans chaque article), et à communiquer les principaux résultats à la communauté scientifique. Une des difficultés majeures dans cette approche est de produire, à la fin des trois ans, une synthèse cohérente, et compréhensible pour le lecteur.

De ce fait, j'ai choisi d'écrire ce mémoire en exposant les principaux résultats, et en présentant la cohérence de cette étude, sous la forme d'une synthèse générale. Afin de faciliter la lecture de ce document, j'ai décidé volontairement de ne pas mettre en forme dans le manuscrit de thèse la partie « matériels et méthodes » qui est détaillée dans les articles situés en annexe. Seul le protocole optimisé pour le dosage des PO est présenté de façon précise en annexe. Les figures plus importantes des articles ont également été

incluses dans la synthèse (elles seront suivies de la précision : « extraite de l'Annexe », suivie du numéro de l'annexe).

Ce manuscrit se découpe en trois chapitres et les annexes ont été placées dans l'ordre proposé par le plan de ce mémoire :

CHAPITRE 1 : Identification des activités phénoloxydase chez *Crassostrea gigas* et implication dans les mécanismes de défense

Partie 1 : Optimisation du protocole de dosage des phénoloxydases chez *Crassostrea gigas*, identification des activités phénoloxydase dans différents tissus et premières pistes sur la caractérisation des protéines responsables de ces activités

Annexe 1 : Matériels et méthodes relatifs au protocole optimisé du dosage des phénoloxydases chez *Crassostrea gigas*

Annexe 2 : Luna-Acosta A, Rosenfeld E, Amari M, Fruitier-Arnaudin I, Bustamante P, Thomas-Guyon H (2010) First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology* 28:719-726

Annexe 3 : Luna-Acosta A, Thomas-Guyon H, Amari M, Rosenfeld E, Bustamante P, Fruitier-Arnaudin I (Soumis) Characterization of tissue-specific phenoloxidase activities in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*

Partie 2 : Implication potentielle des activités phénoloxydase dans les mécanismes de défense de *Crassostrea gigas*

Annexe 4 : Luna-Acosta A, Saulnier D, Pommier M, Haffner P, De Decker S, Renault T, Thomas-Guyon H (Soumis) First evidence of a potential antibacterial activity involving the phenoloxidase system in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*

CHAPITRE 2 : Potentiel des phénoloxydases comme biomarqueurs de l'exposition à des contaminants organiques : Expérimentation *in vivo*

Partie 1 : Modulation des phénoloxydases suite à l'exposition à un herbicide seul ou en mélange

Annexe 5 : Luna-Acosta A, Thomas-Guyon H, Faury N, Saulnier D, Fruitier-Arnaudin I, Bustamante P, Renault T (En préparation) Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron,

isoproturon, ibuprofene) on immunological parameters of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, spat

Partie 2 : Modulation des phénoloxydases suite à une exposition aux hydrocarbures, dispersés chimiquement ou non, par une contamination *via* l'eau ou *via* le sédiment

Annexe 6 : Luna-Acosta A, Kanan R, LeFloch S, Huet V, Pineau P, Bustamante P, Thomas-Guyon H (En préparation) Use of chemical dispersant in coastal and estuarine areas: potential immunotoxic effects of chemically dispersed oil in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, juveniles

Annexe 7 : Richard M, Luna-Acosta A, Prineau M, Huet V, Thomas-Guyon H (En préparation) Influence of contaminated mudflat with dispersed oil on defence mechanisms of oyster (*Crassostrea gigas*): an intertidal mesocosm experiment

CHAPITRE 3 : Potentiel des phénoloxydases comme biomarqueurs de stress environnemental, dans des études de biosurveillance *in situ*

Partie 1 : Variations saisonnières des phénoloxydases, biomarqueurs potentiels de contamination

Annexe 8 : Luna-Acosta A, Bustamante P, Godefroy J, Fruitier-Arnaudin I, Thomas-Guyon H (2010) Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed *in situ*. Environmental Science and Pollution Research 17:999-1008

Partie 2 : Relations entre la réponse des phénoloxydases et la teneur en contaminants organiques dans des expériences de transplantation *in situ*

Annexe 9 : Luna-Acosta A, Bustamante P, Budzinski H, Huet V, Thomas-Guyon H (En préparation) Biological effects of persistent organic pollutants in juveniles of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* : a transplantation study in the French Atlantic coast

Table des matières

Introduction générale.....	1
Etat de l'art.....	11
1. Le modèle biologique: l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	11
2. Les mécanismes de défense chez <i>Crassostrea gigas</i>	20
3. Contaminants affectant les mécanismes de défense chez <i>Crassostrea gigas</i>	31
4. Les biomarqueurs et le stress environnemental.....	36
CHAPITRE 1: Identification des activités phénoloxydase et implication dans les mécanismes de défense immunitaire.....	43
Partie 1: Optimisation du protocole de dosage, identification et caractérisation partielle des phénoloxydases dans différents tissus.....	45
Contexte scientifique.....	46
1. Généralités sur les phénoloxydases et la mélanisation.....	46
2. Aspects biochimiques des phénoloxydases.....	49
3. Le système prophénoloxydase chez les invertébrés.....	54
4. Principales méthodes utilisées pour étudier l'effet des contaminants sur les phénoloxydases des bivalves.....	56
5. Les substrats des phénoloxydases.....	59
6. Les substrats des phénoloxydases et leur interférence avec d'autres protéines.....	60
7. Les inhibiteurs des phénoloxydases.....	61
8. Les activateurs des phénoloxydases.....	63
9. Localisation cellulaire et tissulaire des phénoloxydases chez les bivalves.....	64
10. La structure quaternaire et le poids moléculaire des phénoloxydases chez les bivalves.....	65
11. Les méthodes utilisées pour déterminer la structure des phénoloxydases chez les bivalves.....	66
Démarche scientifique et principaux résultats.....	68
1. Optimisation du protocole de dosage des phénoloxydases chez <i>Crassostrea gigas</i>	68
2. Identification des activités phénoloxydase dans le plasma de <i>Crassostrea gigas</i>	72
Partie 2: Implication des phénoloxydases dans les mécanismes de défense immunitaire de <i>Crassostrea gigas</i>.....	89
Contexte scientifique.....	90
1. Le rôle du système proPO chez les invertébrés.....	90
2. L'infection par les <i>Vibrio</i> chez <i>C. gigas</i> associée aux événements de mortalité estivale.....	91
Démarche scientifique et principaux résultats.....	94
CHAPITRE 2: Potentiel des phénoloxydases comme biomarqueurs de l'exposition à des contaminants organiques: Expérimentations <i>in vivo</i>.....	99
Partie 1: Modulation des phénoloxydases suite à l'exposition à un herbicide seul ou en mélange.....	101
Contexte scientifique.....	102

1. Comportement de l'activité phénoloxydase en présence de contaminants chimiques.....	102
2. Les herbicides et les molécules pharmaceutiques.....	107
Démarche scientifique et principaux résultats.....	110
Partie 2 : Modulation des activités phénoloxydase lors d'une exposition à des hydrocarbures via l'eau ou le sédiment.....	117
Contexte scientifique.....	118
Démarche scientifique et principaux résultats.....	119
CHAPITRE 3 : Potentiel des phénoloxydases comme biomarqueur de stress dans des études de biosurveillance <i>in situ</i>.....	129
Partie 1 : Implication des facteurs environnementaux dans les variations saisonnières des activités phénoloxydase.....	131
Contexte scientifique.....	132
1. Variations physiologiques saisonnières de l'activité phénoloxydase.....	132
2. Facteurs environnementaux susceptibles de moduler l'activité phénoloxydase.....	133
Démarche scientifique et principaux résultats.....	136
Partie 2 : Effets d'une transplantation in situ sur les activités phénoloxydase et la teneur en contaminants organiques.....	141
Démarche scientifique et principaux résultats.....	142
Discussion générale et conclusions.....	149
1. Rôle des phénoloxydases chez <i>C. gigas</i>	149
2. Limitations à utiliser les phénoloxydases chez <i>Crassostrea gigas</i> comme biomarqueurs de stress environnemental.....	151
3. Avantages à utiliser les phénoloxydases chez <i>Crassostrea gigas</i> comme biomarqueurs de stress environnemental.....	153
Perspectives.....	157
1. Y a-t-il une relation entre la réduction des activités PO et la réduction de l'immunité?.....	157
2. Y a-t-il une relation entre la réduction de l'immunité, et donc de l'apparition des mortalités estivales, et les contaminants?.....	159
3. Quels contaminants sont susceptibles de réduire cette immunité?.....	161
Références bibliographiques.....	165
Annexes.....	183
Annexe 1 : Matériels et méthodes relatifs au protocole optimisé du dosage des phénoloxydases chez <i>Crassostrea gigas</i>.....	185
Annexe 2 : First evidence of laccase activity in the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i>.....	191
Annexe 3 : Characterization of tissue-specific phenoloxidase activities in the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i>.....	211
Annexe 4 : First evidence of a potential antibacterial activity involving the phenoloxidase system in the Pacific cupped oyster <i>Crassostrea gigas</i> hemocytes.....	229

Annexe 5 : Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofene) on immunological parameters of Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i> , spat.....	247
Annexe 6 : Use of chemical dispersant in coastal and estuarine areas: potential immunotoxic effects of chemically dispersed oil in Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i> , juveniles.....	269
Annexe 7 : Influence of contaminated mudflat with dispersed oil on defence mechanisms of oyster (<i>Crassostrea gigas</i>): an intertidal mesocosm experiment.	299
Annexe 8 : Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on the health status of juvenile Pacific oysters <i>Crassostrea gigas</i> exposed <i>in situ</i>	319
Annexe 9 : Biological effects of persistent organic pollutants in juveniles of the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> : a transplantation study in the French Atlantic coast.....	337

Liste des figures

Figure 1 Schéma de la triade épidémiologique.....	2
Figure 2 Contexte de la thèse.....	8
Figure 3 Soutien financier et collaborations extérieures au laboratoire d'accueil.....	9
Figure 4 Présentation générale du modèle d'étude, l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	12
Figure 5 Place de <i>Crassostrea gigas</i> au sein du réseau trophique.....	14
Figure 6 Cycle de production de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	17
Figure 7 Evolution de la mortalité des naissains d'huîtres en 2010.....	19
Figure 8 Types hémocytaires chez <i>Crassostrea gigas</i>	23
Figure 9 Les processus de phagocytose et d'encapsulation.....	24
Figure 10 Site d'action du lysozyme sur les peptidoglycanes des parois bactériennes.....	26
Figure 11 Le stress oxydant et les enzymes antioxydantes.....	27
Figure 12 Activation du système prophénoloxydase (proPO) chez les invertébrés....	29
Figure 13 Voies majeures conduisant à la détoxification et à la toxication des xénobiotiques organiques.....	31
Figure 14 Représentation schématique de la relation entre la détection d'un signal de stress environnemental et la possible signification écologique à long terme.....	37
Figure 15 Schéma des réponses des organismes aux effets délétères de l'exposition à des polluants.....	38
Figure 16 Enchaînement des effets toxiques sur les différents niveaux d'organisation biologique.....	39
Figure 17 La mélanisation chez les êtres vivants.....	48
Figure 18 La classification des phénoloxydases.....	50
Figure 19 Structure primaire des phénoloxydases.....	52
Figure 20 Structure cristallographique d'une phénoloxydase.....	53
Figure 21 Activation du système prophénoloxydase (proPO) et de l'immunité cellulaire chez les crustacés.....	55
Figure 22 Effet de la nature du tampon sur l'activité PO.....	70
Figure 23 Consommation d'oxygène durant la réaction d'oxydation des substrats des PO.....	74
Figure 24 Effets de la catalase sur l'autooxydation et sur l'activité enzymatique de type PO.....	75
Figure 25 Effets des inhibiteurs des phénoloxydases sur l'autooxydation et sur l'activité PO en présence de dopamine.....	77
Figure 26 Effets des inhibiteurs des phénoloxydases sur l'autooxydation et sur l'activité PO en présence de PPD.....	78
Figure 27 Effet des activateurs des phénoloxydases sur l'autooxydation et l'oxydation enzymatique de la dopamine.....	79
Figure 28 Effet des activateurs des phénoloxydases sur l'autooxydation et l'oxydation enzymatique de la PPD.....	80
Figure 29 Inhibition de l'activité de type phénoloxydase sur des fractions de protéines précipitées du plasma et du HLS.....	84
Figure 30 Démarche entreprise pour l'identification protéique des PO chez <i>Crassostrea gigas</i>	86

Figure 31 Protocole utilisé pour étudier l'effet des activités PO sur la croissance des <i>Vibrio</i>	95
Figure 32 Effet du HLS brut et de l'inhibiteur spécifique des PO, la PTU, sur la croissance de <i>V. splendidus</i> LGP32, avec L-DOPA ou PPD comme substrats.....	96
Figure 33 Effet des fractions protéiques partiellement purifiées de HLS et de l'inhibiteur spécifique des PO, la PTU, sur la croissance de <i>V. splendidus</i> LGP32, avec L-DOPA ou PPD comme substrats.....	96
Figure 34 Protocole de l'expérience de contamination en présence de diuron à 1 µg.l ⁻¹	112
Figure 35 Protocole de l'expérience de contamination en présence d'un mélange de 5 µg diuron.l ⁻¹ , 5 µg d'isoproturon.l ⁻¹ et 5 µg d'ibuprofène.l ⁻¹	112
Figure 36 Effet du diuron (1 µg.l ⁻¹) sur l'activité enzymatique de <i>Crassostrea gigas</i>	114
Figure 37 Effet du diuron (1 µg.l ⁻¹) sur l'expression de gènes chez <i>Crassostrea gigas</i> par rapport au contrôle à chaque temps.....	115
Figure 38 Effet d'un mélange d'herbicides (diuron à 5 µg.l ⁻¹ , isoproturon à 5 µg.l ⁻¹) et d'une molécule pharmaceutique (ibuprofène à 5 µg.l ⁻¹) sur la phagocytose cellulaire et l'activité catécholase plasmatique.....	115
Figure 39 Protocole d'exposition aux hydrocarbures <i>via</i> l'eau.....	120
Figure 40 Protocole d'exposition à de la vase contaminée aux hydrocarbures.....	125
Figure 41 Aire d'échantillonnage sur la côte Atlantique française.....	137
Figure 42 Conséquences possibles de la réponse des activités PO chez <i>Crassostrea gigas</i>	152
Figure 43 Rôles potentiels des PO chez <i>Crassostrea gigas</i>	155
Figure 44 Bilan de la thèse : hypothèses de départ, principaux résultats, perspectives.....	163

Liste des tableaux

Tableau 1 Le système immunitaire inné chez <i>Crassostrea gigas</i>	22
Tableau 2 Effet des contaminants organiques sur les mécanismes de défense immunitaire chez <i>Crassostrea gigas</i>	34
Tableau 3 Classification et exemples de biomarqueurs pouvant être utilisés chez les bivalves marins.....	41
Tableau 4 Principaux rôles de la mélanine chez les êtres vivants.....	47
Tableau 5 Spécificité d'action des phénoloxydases.....	51
Tableau 6 Principales méthodes utilisées pour étudier l'effet des contaminants sur les phénoloxydases des bivalves.....	58
Tableau 7 Protéines capables d'utiliser les substrats de phénoloxydases.....	61
Tableau 8 Mode d'action des inhibiteurs des phénoloxydases.....	62
Tableau 9 Localisation et rôle des PO dans différents tissus de bivalves.....	65
Tableau 10 Poids moléculaire des PO des mollusques rapportés dans la littérature.	66
Tableau 11 Récapitulatif des paramètres étudiés pour optimiser le protocole de dosage des activités phénoloxydase chez <i>Crassostrea gigas</i>	71
Tableau 12 Identification de l'activité de type PO dans le plasma de <i>Crassostrea gigas</i> , en utilisant une large gamme de substrats.....	73
Tableau 13 Inhibiteurs de phénoloxydases choisis pour cette étude.....	76
Tableau 14 Récapitulatif des principales questions auxquelles nous avons pu répondre dans le cadre de cette thèse sur l'activité de type PO présente dans le plasma de <i>Crassostrea gigas</i>	82
Tableau 15 Synthèse des activités PO identifiées dans l'hémolymphe de <i>Crassostrea gigas</i>	84
Tableau 16 Identification des activités PO identifiées dans différents tissus de <i>Crassostrea gigas</i>	85
Tableau 17 Bilan de l'identification et de la caractérisation des activités de type PO dans les tissus et les compartiments hémolympatiques de <i>Crassostrea gigas</i>	88
Tableau 18 Etudes sur la modulation de l'activité PO en relation avec des expériences d'exposition à des agents pathogènes ou toxiques.....	93
Tableau 19 Implication des PO chez <i>Crassostrea gigas</i> dans l'inhibition de la croissance de souches bactériennes pathogènes, <i>Vibrio splendidus</i> LGP32 et <i>V. aesturianus</i> 02/041.....	97
Tableau 20 Effet des métaux sur l'activité PO constitutive chez les bivalves.....	104
Tableau 21 Effet des hydrocarbures et des biocides sur l'activité PO constitutive chez les bivalves.....	104
Tableau 22 Effet des contaminants sur l'activité PO chez des organismes autres que les bivalves.....	106
Tableau 23 Exemples d'études sur l'effet des contaminants sur l'activité PO stimulée.....	109
Tableau 24 Paramètres pris en considération et changés dans le cadre de cette thèse, en comparaison à des expériences d'exposition aux herbicides réalisées dans le passé chez <i>Crassostrea gigas</i>	110
Tableau 25 Gènes impliqués dans les mécanismes de défense, références des gènes choisis pour l'analyse en PCRq et séquences sélectionnées pour les amorces.....	113
Tableau 26 Résultats des tests de corrélation de rang de Spearman entre l'activité	

catécholase (C) ou laccase (L) et la teneur en hydrocarbures dans les huîtres après 2 jours d'exposition à un pétrole de type BAL 100 (66 mg.l ⁻¹ de BAL 110 +/- 3 mg.l ⁻¹ de dispersant).....	123
Tableau 27 Résultats des tests de corrélation de rang de Spearman sur les réponses biologiques dans différents tissus de <i>Crassostrea gigas</i> exposée à des hydrocarbures dispersés chimiquement ou mécaniquement, pendant 2 jours.....	124
Tableau 28 Résultats des tests de corrélation de rang de Spearman sur les réponses biologiques dans le plasma de <i>Crassostrea gigas</i> exposées à de la vase contaminé aux hydrocarbures, pendant 10 jours.....	126
Tableau 29 Récapitulatif des expériences et principaux résultats obtenus sur la modulation des activités PO chez <i>C. gigas</i> suite à l'exposition à des contaminants organiques <i>in vivo</i>	127
Tableau 30 Facteurs pouvant avoir un effet sur les réponses immunitaires chez les bivalves.....	134
Tableau 31 Exemples de facteurs ayant un effet sur l'activité PO chez les bivalves.	135
Tableau 32 Synthèse sur la teneur en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en polychlorobiphényles (PCB), polybromodiphényléthers (PBDE) et les pesticides organochlorés (OCP) dans les huîtres.....	140
Tableau 33 Variations saisonnières des activités catécholase et laccase chez <i>Crassostrea gigas</i> dans les huîtres provenant du site de référence et des sites de transplantation.....	140
Tableau 34 Résultats des tests de corrélation de rang de Spearman entre l'activité catécholase (C) ou laccase (L) et la teneur en contaminants dans les huîtres après trois mois de transplantation de Bouin (Vendée) à différents sites de Marennes-Oléron et de l'estuaire de la Gironde, en été ou en hiver.....	143
Tableau 35 Résultats des tests de corrélation de rang de Spearman sur les réponses biologiques dans différents tissus de <i>Crassostrea gigas</i> transplantés dans différents sites de la côte Atlantique française, pendant trois mois, en été.....	146
Tableau 36 Résultats des tests de corrélation de rang de Spearman sur les réponses biologiques dans différents tissus de <i>Crassostrea gigas</i> transplantés dans différents sites de la côte Atlantique française, pendant trois mois, en hiver.....	147
Tableau 37 Résultats des tests de corrélation de rang de Spearman sur les réponses biologiques dans différents tissus de <i>Crassostrea gigas</i> transplantés dans différents sites de la côte Atlantique française, sur l'année.....	148

Introduction générale



Source : blog.villagevoice.com

Les zones côtières et estuariennes ont une importance écologique et économique majeure. En effet, elles sont à l'origine d'une grande productivité et constituent l'aire d'alimentation, de reproduction, de nurserie, d'abri ou d'habitat pour un grand nombre d'espèces (Johnston 1981). Parmi les organismes habitant ces zones, l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Thunberg 1753) est considérée comme une espèce ingénieure¹ de l'écosystème (Badano & Cavieres 2006). Avec une production mondiale d'environ 5 millions de tonnes par an, *C. gigas* est l'espèce aquacole la plus commercialisée dans le monde, produite principalement en Chine, au Japon, en Corée et en France (ce dernier étant le premier producteur en Europe ; FAO 2010).

Depuis son introduction dans différents pays du monde, comme la France, dans les années 1970s, des phénomènes de mortalité de *C. gigas* affectaient jusqu'à 50% de la population chaque été. Depuis quelques années, les taux de mortalités estivales de *C. gigas*, notamment au stade juvénile, ont fortement augmenté, affectant de 40 à 100% les populations sauvages et aquacoles, toutes ploïdies confondues (Ifremer 2009). Ces

¹ Espèce ingénieure de l'écosystème : espèce capable de créer, maintenir ou détruire l'habitat d'autres espèces en modulant le milieu environnant (Badano & Cavieres, 2006)

mortalités sembleraient être liées à des infections par des agents pathogènes (virus et/ou bactéries), probablement dues à une fragilisation des capacités de défense (Perdue *et al.* 1981, Cheney *et al.* 2000, Samain 2007). Cet affaiblissement semblerait être dû à une cause multi-factorielle.

Selon Snieszko (1974), le déclenchement d'une maladie infectieuse chez l'hôte résulte des interactions conduisant à un déséquilibre entre les différents acteurs de la triade « hôte - agent pathogène - environnement ». Ce déséquilibre peut être provoqué par des facteurs environnementaux (paramètres physico-chimiques du milieu environnant) et/ou par des facteurs internes à l'hôte (sensibilité accrue de l'hôte) et/ou à l'agent pathogène (virulence de l'agent infectieux ; **Figure 1**).

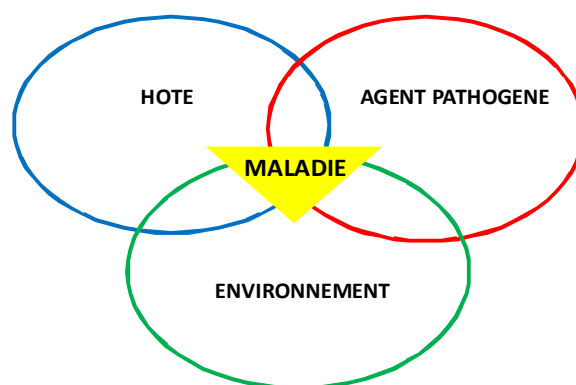


Figure 1 Schéma de la triade épidémiologique (hôte - agent pathogène - environnement). Modifié d'après Snieszko 1974.

Parmi les facteurs environnementaux pouvant provoquer un déséquilibre de cette triade, différentes études ont montré que certains contaminants chimiques présents dans le milieu, tels que les contaminants organiques, seraient susceptibles de moduler les capacités de défense immunitaire chez divers organismes aquatiques (Galloway & Depledge 2001).

Des contaminants organiques, tels que les hydrocarbures, peuvent être introduits dans le milieu par des phénomènes naturels comme les éruptions volcaniques ou la dégradation de la matière organique. Mais ce sont les activités anthropiques, d'origine industrielle, domestique ou agricole, les principales responsables du rejet dans l'environnement de nombreux composés organiques qui contaminent les écosystèmes. Ainsi, une partie non négligeable de contaminants de type hydrocarbures, polychlorobiphényles, pesticides ou

« émergents² » (e.g., produits pharmaceutiques, alkylphénols, retardateurs de flamme bromés) aboutissent *in fine* à la mer (Amiard & Amiard-Triquet 2008).

De façon générale, lorsque ces produits ne sont pas dégradables par voie biologique ni chimique, ils vont s'accumuler dans le milieu marin, notamment au niveau des sédiments (Clark 2001). Les facteurs physico-chimiques du milieu tels que la température de l'eau, la salinité, le pH, ou le taux d'oxygénation, vont déterminer leur spéciation chimique³. Cette spéciation gouverne la biodisponibilité⁴ pour les organismes, c'est-à-dire la forme du contaminant qui favorise sa liaison ou son passage au travers des surfaces de l'organisme qui sont en contact avec l'eau (e.g., téguments ou muqueuses). Le contaminant peut ainsi, rentrer par ad- ou absorption de la phase dissoute ou particulaire vers le tissu, puis, des processus passifs (chimiques) ou actifs (biologiques) peuvent découler. A l'intérieur de l'organisme ces composés peuvent être bioaccumulés⁵, c'est-à-dire bioconcentrés⁶ ou bioamplifiés⁷ jusqu'à des niveaux supérieurs à ceux de la contamination du milieu physique. D'autre part, certains composés hydrosolubles sont moins susceptibles d'être accumulés dans l'organisme. Cependant, l'utilisation continue et massive par l'Homme de ce type de composés, font que les organismes se trouvent en contact avec ces molécules de façon continue.

Du fait de leur présence massive dans les zones côtières, soumises à des contaminations de tout type, leur mode de vie benthique et fixé au substrat (organismes sessiles), leur mode d'alimentation par filtration et leurs faibles capacités de métabolisation de certains contaminants, de nombreuses espèces de mollusques bivalves, sauvages ou d'aquaculture, sont considérés comme des espèces sentinelles⁸ (Phillips 1980). Le réseau le plus connu utilisant les bivalves comme espèces sentinelles est le Mussel Watch Program aux USA, qui réalise un suivi de la contamination environnementale, en dosant la teneur de différents contaminants dans la chair des moules. En France, un réseau similaire a été

² Contaminants émergents : produits chimiques présents dans le milieu naturel depuis de nombreuses années mais dont on ne connaît pas ou peu leurs effets sur les organismes aquatiques

³ Spéciation chimique : ensemble des espèces chimiques sous lesquelles un élément se présente dans un environnement donné

⁴ Biodisponibilité : proportion d'une substance qui va effectivement agir dans l'organisme par rapport à la quantité absorbée

⁵ Bioaccumulation : accumulation des composés *via* l'eau, le sédiment ou la nourriture

⁶ Bioconcentration : accumulation des composés directement depuis le milieu environnant (*via* l'eau)

⁷ Bioamplification : accumulation des composés depuis la nourriture faisant que les taux de certaines substances croissent à chaque stade du réseau trophique

⁸ Espèce sentinelle : espèce dont son absence ou son abondance, ou bien dont les modifications biologiques au niveau organique, tissulaire, cellulaire ou moléculaire, servent d'indicateurs précoces des changements de l'environnement d'un écosystème donné (Amiard & Amiard-Triquet 2008)

mis en place, le réseau ROCCH (Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du littoral, ex-RNO). L'huître creuse *C. gigas* est utilisée par ce réseau comme espèce sentinelle dans des zones où les moules *Mytilus edulis* sont peu ou moins présentes.

La bioaccumulation des contaminants peut causer, directement ou indirectement, des effets nuisibles sur les principaux systèmes physiologiques comprenant les systèmes endocrinien, reproducteur, nerveux et immunitaire chez les organismes marins et peuvent avoir des conséquences écologiques majeures (Galloway & Depledge 2001). Si bien la biodisponibilité et la bioaccumulation des contaminants peuvent être corrélées à l'apparition d'effets nocifs sur les organismes, il est important de garder à l'esprit qu'un contaminant à très fortes doses dans le milieu naturel peut ne pas exercer d'effet nocif sur un organisme donné tandis qu'un autre contaminant à de très faibles doses peut être très nocif voir létale pour cet organisme. De plus, des systèmes de détoxification peuvent être activés dans le but de biotransformer le contaminant présent dans l'organisme en molécules moins toxiques et favoriser son élimination par l'organisme. Cependant, dans certains cas, les contaminants peuvent être biotransformés en métabolites réactifs, plus toxiques que la molécule mère, et qui vont interagir avec des macromolécules cellulaires. Ainsi, les effets des contaminants varient en fonction de nombreux facteurs extrinsèques (nature chimique du contaminant, solubilité dans l'eau, persistance dans le milieu naturel, similarité chimique de ce contaminant avec d'autres molécules présentes dans l'organisme) et intrinsèques (capacité de l'organisme à métaboliser, absorber et/ou excréter ce composé).

Les contaminants peuvent provoquer un stress physiologique chez l'organisme lorsqu'ils sont présents à de très fortes concentrations dans le milieu naturel et/ou lorsque les capacités de détoxification de l'organisme sont altérées. De ce fait, les contaminants peuvent être un des facteurs favorisant l'affaiblissement des mécanismes de défense de l'hôte, et par conséquent, de l'apparition et/ou de l'augmentation de maladies (Perdue *et al.* 1981, Lacoste *et al.* 2001a, Ross *et al.* 2002, Gagnaire *et al.* 2007).

Les analyses physico-chimiques donnent des indications sur la présence d'une contamination ou d'une pollution⁹ et permettent d'appréhender leur devenir dans le

⁹ Pollution : contamination d'un ou plusieurs composants des écosystèmes, d'un organisme ou d'un groupe d'organismes, ou ayant une incidence sur l'écosystème, au-delà d'un seuil ou norme.

milieu naturel, mais elles ne renseignent pas sur l'impact réel du contaminant sur sa cible finale, c'est-à-dire l'organisme vivant et encore moins sur les effets potentiels à l'échelle de la population, voire de l'écosystème. La biosurveillance, correspondant à l'étude de la réponse biologique des organismes à un stress environnemental, devient alors indispensable (Amiard & Amiard-Triquet 2008). Les biomarqueurs, outils fondamentaux de la biosurveillance, sont définis comme étant des réponses biologiques (aux niveaux biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental) qui, dans un tissu, un liquide corporel ou un organisme entier, permettent de mettre en évidence l'exposition et/ou les effets d'un ou plusieurs contaminants (Depledge, 1993, Lagadic *et al.* 1997, Galloway & Depledge 2001, Van der Oost *et al.* 2003). Ils permettent donc de diagnostiquer de façon précoce des dysfonctionnements physiologiques de l'individu, c'est-à-dire avant que des dommages tissulaires ou sur les principales fonctions biologiques ne soient détectables (Van der Oost *et al.* 2003).

Parmi les protéines susceptibles d'être modulées par la présence de contaminants dans le milieu naturel, les PO sont les enzymes-clés d'une cascade biochimique ubiquitaire responsable de la production de mélanine, intervenant dans les défenses immunitaires, les processus de réparation des blessures, d'encapsulation et de mélanisation et les mécanismes de reconnaissance du soi/non-soi chez les invertébrés (Söderhäll & Cerenius 1998, Cerenius *et al.* 2008). Différentes études ont montré qu'il existe une forte corrélation entre la diminution des activités PO chez l'huître *Saccostrea glomerata* et l'apparition de la maladie du Queensland (QX disease, en anglais), causée par le parasite *Marteilia sydneyia* et provoquant des mortalités chez l'hôte (Peters & Raftos 2003, Newton *et al.* 2004, Bezemer *et al.* 2006). Les résultats de ces études suggèrent que les PO pourraient jouer un rôle primordial dans les mécanismes de défense chez les bivalves.

Récemment, une activité de type PO a été détectée dans l'hémolymph de l'huître creuse *C. gigas* (Luna-González *et al.* 2003, Hellio *et al.* 2007), à différents stades de développement (Thomas-Guyon *et al.* 2009) et différents auteurs ont montré que cette activité pouvait être modulée *in vitro* par des contaminants inorganiques tels que les métaux lourds (Gagnaire *et al.* 2004) et *in vivo* par des contaminants organiques tels que les hydrocarbures (Bado-Nilles *et al.* 2009). De plus, à l'échelle moléculaire, un gène codant pour une PO de type laccase a été identifié chez *C. gigas* et une activation de l'expression de ce gène a été observée suite à une exposition de *C. gigas* à des hydrocarbures (Bado-Nilles *et al.* 2010). L'ensemble de ces résultats a mené à une

réflexion quant au potentiel des PO à être utilisées comme biomarqueurs de contamination.

Dans ce contexte général, le but de cette thèse a été d'approfondir les connaissances sur les aspects biochimiques et fonctionnels des PO chez *C. gigas* et d'évaluer le potentiel de ces enzymes à être utilisées comme biomarqueurs de stress environnemental, lié à une contamination de type organique (**Figure 2**).

L'ensemble de ces travaux ont été réalisés dans différents organismes de recherche en collaboration avec différents laboratoires :

- Pour la première partie, la majorité des expériences ont été réalisées au laboratoire LIENSs. Seules les expériences en spectrométrie de masse ont été réalisées à l'Institut Claude Bernard de l'INSERM (Paris). L'étude sur l'implication des PO dans les mécanismes de défense de *C. gigas* a été réalisée à l'Ifremer, au Laboratoire de Génétique et de Pathologie (LGP) de La Tremblade, possédant des souches bactériennes pathogènes de *C. gigas* et une grande expérience sur les pathologies et les mécanismes de défense chez les invertébrés marins.
- Pour la deuxième partie, la première phase des expériences d'exposition *in vivo* ont été réalisées au LGP Ifremer de La Tremblade, permettant la réalisation de la cytométrie de flux sur du matériel frais et de la réaction en chaîne par polymérase en temps réel (PCRq). Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du Projet de Recherche de la Région Poitou-Charentes « POLERON » (Modifications chimiques de polluants organiques dans le bassin de Marennes-Oléron, toxicité des produits de dégradation sur l'huître creuse). La deuxième phase des expériences d'exposition *in vivo* a été réalisée dans le cadre du Programme Ecotechnologies et Développement Durable (PRECODD) de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) du projet de recherche « DISCOBIOL » (Dispersants et technique de lutte en milieux côtiers : effets biologiques et apports à la réglementation) dans les installations du Cedre (CEntre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentation sur les pollutions accidentelles de l'eau) à Brest. Puis, la troisième phase des expériences *in vivo* a été réalisée dans les installations du Marais du Plomb de la Fédération de Recherche en Environnement pour le Développement Durable (FREDD), localisées à l'Houmeau.

- Pour la troisième partie, nous avons pu bénéficier d'un échantillonnage mis en place pour un programme de recherche extérieur à la thèse (Programme interrégional Défi Cadmium : suivi triennal de l'élément cadmium dans le continuum Riou-mort/Lot/Garonne/Estuaire de la Gironde/Bassin de Marennes-Oléron/Seudre et Charente).

Afin de compléter nos études biochimiques sur les expériences *in vivo* et *in situ*, des analyses chimiques ont été réalisées au Laboratoire de Physico-Chimie des systèmes naturels (LPTC) de Bordeaux, à l'Institut Départemental d'analyses, de conseil et d'expertise en Hygiène alimentaire, Eau et environnement et Santé Animale (IDHESA) et au Cedre (**Figure 3**).

Ainsi, la planification des expériences, la mise en place des protocoles d'exposition aux contaminants, la préparation des échantillons (broyages, centrifugations), les dosages enzymatiques, le traitement des données et les analyses statistiques de l'ensemble des expériences, *in vitro*, *in vivo* et *in situ*, ont été réalisés au laboratoire LIENSs. Puis, différents déplacements ont été effectués à Brest, à Bordeaux, à La Tremblade et à l'Houmeau, dans le but de réaliser les expérimentations et la réalisation de certaines analyses (cytométrie de flux, PCRq, dosages des contaminants dans l'eau).

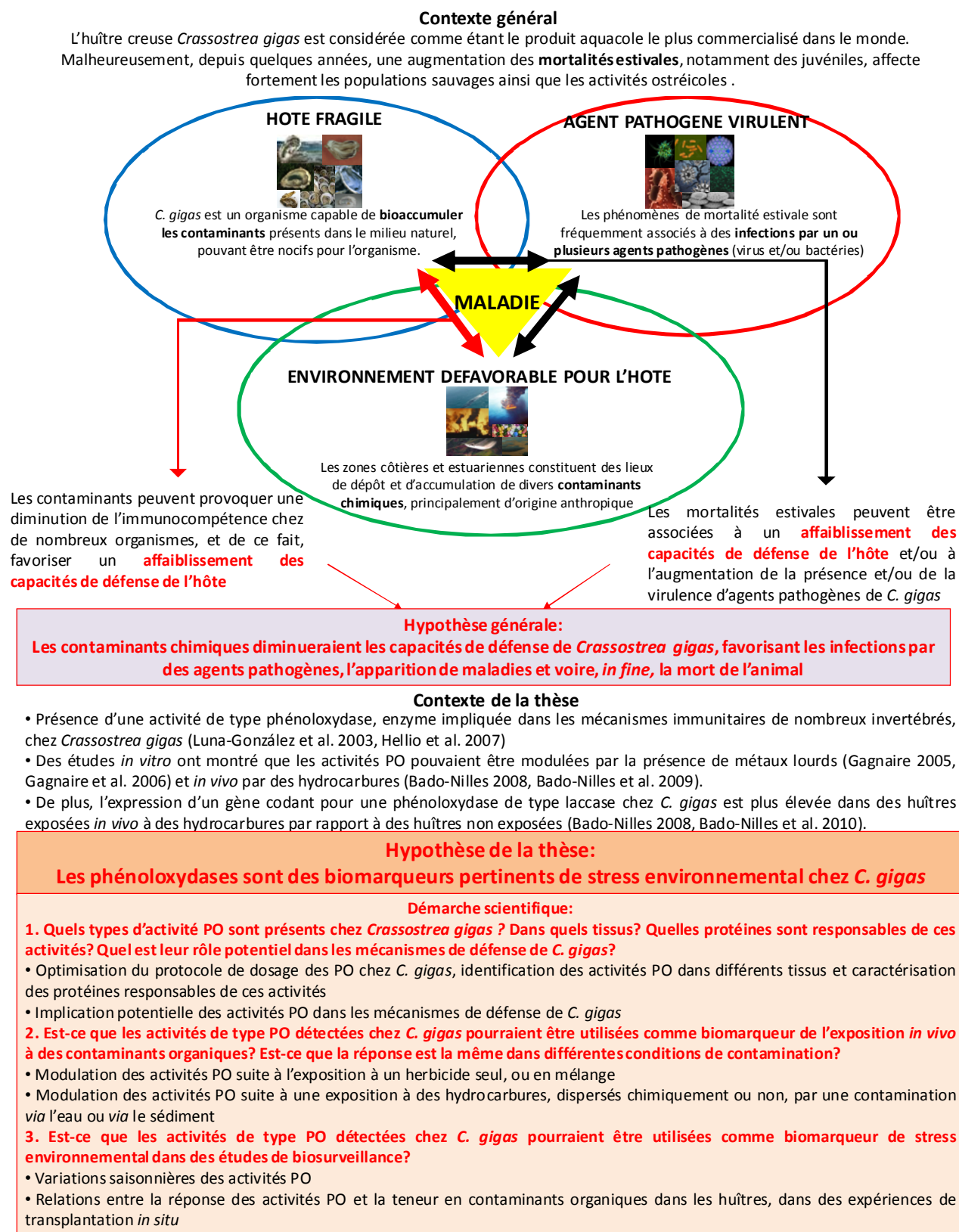


Figure 2 Contexte de la thèse



Figure 3 Soutien financier et collaborations extérieures au laboratoire d'accueil. Inserm : Institut national de la santé et de la recherche médicale ; Cedre : Centre de documentation, de recherche et d'expérimentation sur les pollutions accidentelles de l'eau ; AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments ; UBO : Université de Bretagne Occidentale ; IDHESA : Institut départemental d'analyses, de conseil et d'expertise en hygiène alimentaire, eau et environnement et santé animale ; LCME : Laboratoire de chimie et microbiologie de l'eau (Université de Poitiers) ; ANR : Agence nationale de la recherche ; LGP : Laboratoire de génétique et pathologie (Ifremer) ; LPTC : Laboratoire de physico-chimie des systèmes naturels (Université de Bordeaux 1).

Etat de l'art



Source : <http://fhsferronbio.wikispaces.com/>

1. Le modèle biologique : l'huître creuse *Crassostrea gigas*

1.1. Taxonomie et répartition

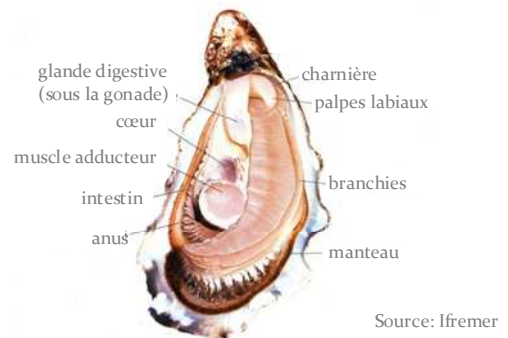
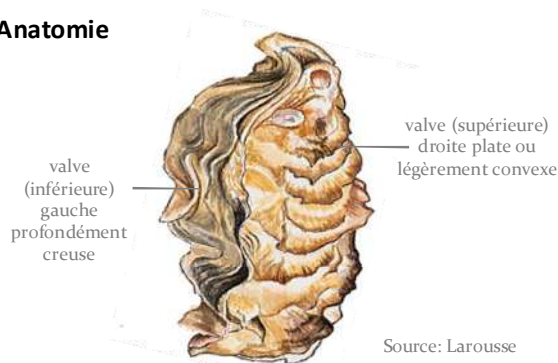
L'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg 1753) est un mollusque bivalve de la famille des *Ostreidae* (voir taxonomie, **Figure 4**), originaire du Nord-Ouest du Pacifique (**Figure 4**). Du fait de sa croissance rapide et de sa tolérance à différentes conditions environnementales, cette espèce a fait l'objet de nombreuses introductions à travers le monde, remplaçant ainsi les stocks d'huîtres indigènes épuisés par la surexploitation ou les maladies (voir exemple sur la France, **Figure 4**).

L'huître creuse *Crassostrea gigas*

1. Classification

Règne: *Animalia*
 Embranchement: *Mollusca*
 Classe: *Bivalvia*
 Sous-classe: *Pteriomorpha*
 Ordre: *Ostreoida*
 Famille: *Ostreidae*
 Genre: *Ostrea*
 Nom binomial: *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)

2. Anatomie



3. Habitat et biologie

Habitat: zone intertidale: substrats rocheux, structures ostréicoles laissées à l'abandon ou infrastructures marines (cale, jetée), substrats meubles (fonds vaseux et sablo-vaseux). Ces organismes hétérothermes ou ectothermes, supportent une large gamme de salinité et de température, les optima se situant entre 20 et 25 pour la salinité et entre 15 et 25°C pour la température.

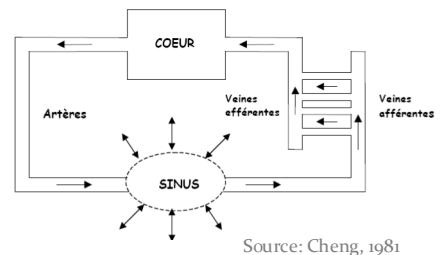
Système nerveux: constitués de ganglions. Les sécrétions sont de type aminergique (sérotonine et dopamine) et peptidergique.

Système circulatoire: Le cœur est formé d'un ventricule et de deux oreillettes. Le système cardio-vasculaire est semi-ouvert (propulsion du fluide corporel, l'hémolymphe, par le ventricule et collecte par des sinus).

Régime alimentaire: organisme suspensivore (se nourrit de particules en suspension) qui filtre jusqu'à plusieurs litres d'eau de mer par heure et absorbe les organismes planctoniques, notamment les algues phytoplanctoniques, sources de nourriture, retenus par les cils sur les branchies ou enrobés de mucus et transportés vers la bouche. Il peut aussi absorber des substances dissoutes présentes dans l'eau de mer (lipides).

Reproduction: hermaphrodite protandre (mâle la première année puis change de sexe). Sur les côtes atlantiques, la reproduction a lieu en été. La ponte des œufs par les femelles a lieu une ou plusieurs fois par été lorsque la température de l'eau est supérieure à 18°C. La fécondation est externe. Les larves vont dériver avec la masse d'eau pendant environ trois semaines avant de se métamorphoser en jeunes individus, et se fixer sur le substrat. A ce stade, ils sont appelés naissains.

Système circulatoire de *C. gigas*



Cycle de vie de *C. gigas*

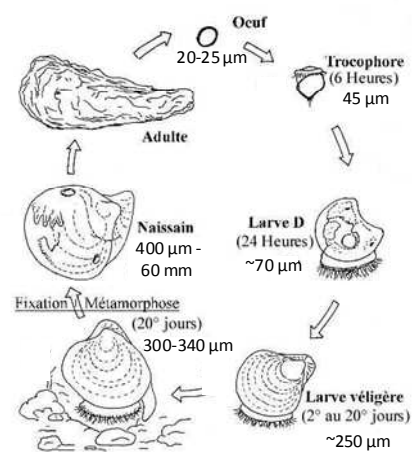
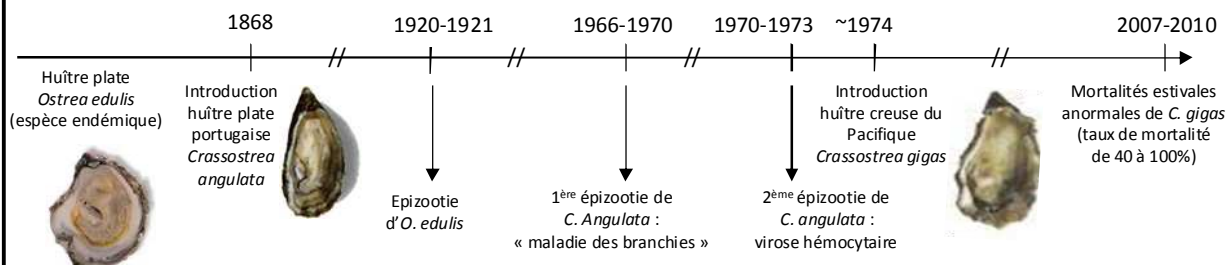


Figure 4 Présentation générale du modèle d'étude, l'huître creuse *Crassostrea gigas*

L'huître creuse *Crassostrea gigas* (suite)

4. Contexte historique en France

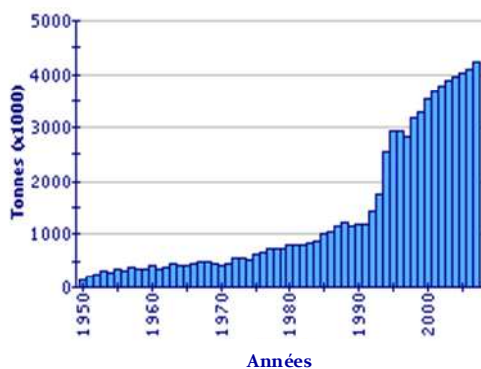


5. Principaux pays producteurs de *C. gigas*

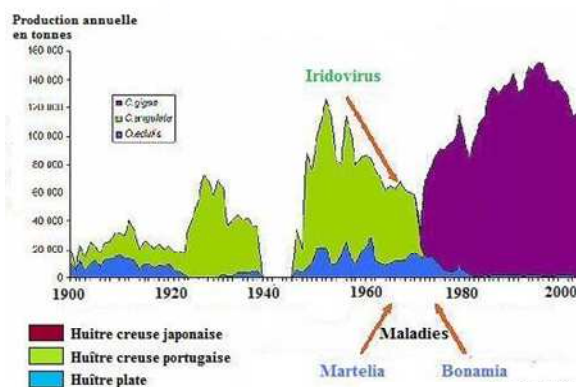


Source: FAO

6. Production mondiale (à gauche) et en France (à droite) de *C. gigas*



Source: FAO



Source: Ifremer

Figure 4 (suite) Présentation générale du modèle d'étude, l'huître creuse *Crassostrea gigas*

1.2. Ecologie

Cette espèce habite préférentiellement dans les substrats rocheux sur lesquels elle peut se fixer, mais peut habiter également sur les substrats meubles tels que les vasières ou être cultivée en pleine eau, jusqu'à 40 mètres de profondeur. Il s'agit d'un organisme bivalve poïkilotherme¹⁰, euryhalin¹¹ et eurytherme¹², avec des optima de salinité entre 22 et 25, et des optima de température entre 15 et 25°C.

Au sein de l'écosystème, *C. gigas* consomme des producteurs primaires et des bactéries et est consommée, à son tour, par différentes espèces de téléostéens, échinodermes, gastéropodes, oiseaux et par l'Homme (**Figure 5**).

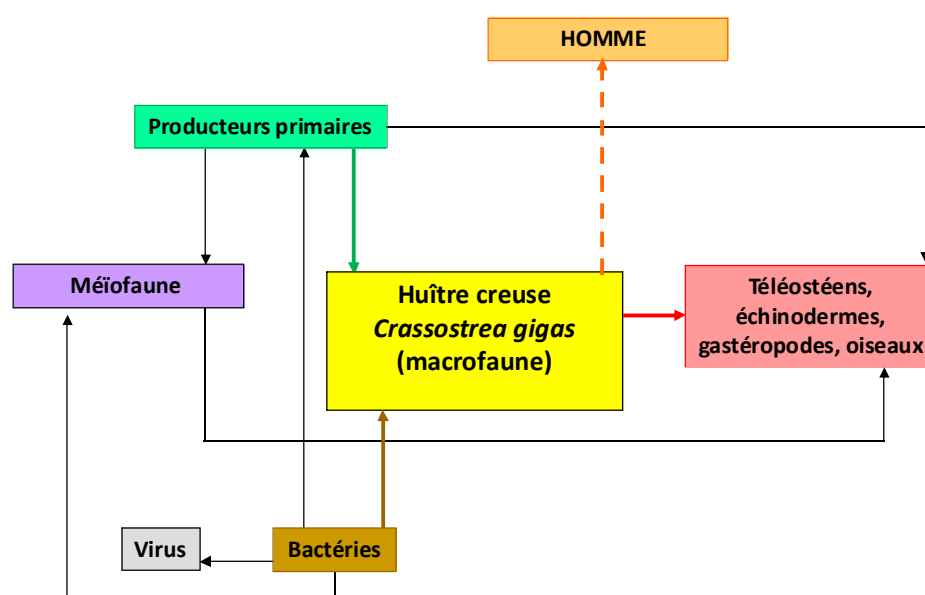


Figure 5 Place de *Crassostrea gigas* au sein du réseau trophique.

Du fait de son abondance et de son activité de filtration, *C. gigas* est considérée comme une espèce ingénieure de l'écosystème. Sa capacité de colonisation du milieu est tellement importante que l'huître creuse fait également partie de la liste des espèces invasives¹³

¹⁰ Poïkilotherme : animaux dont la température corporelle varie avec celle du milieu extérieur

¹¹ Euryhalin : organisme aquatique capable de supporter de grandes variations de salinité

¹² Eurytherme : organisme aquatique capable de supporter de grandes variations de température

¹³ Espèce invasive : espèce vivante allochtone, non indigène, exogène ou étrangère, qui devient un agent de perturbation nuisible à la biodiversité autochtone des écosystèmes naturels ou semi naturels parmi lesquels elle s'est établie (d'après l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature, UICN)

(GISD, Global Invasive Species Database administrée par l'ISSG, Invasive Species Specialist Group) (NIMPIS 2009).

1.3. Biologie

1.3.1. Anatomie

L'huître creuse *C. gigas* est constituée d'un corps mou, protégé par une coquille à deux valves asymétriques, avec une valve (inférieure) gauche, profondément creuse, et une valve (supérieure) droite, plate ou légèrement convexe (**Figure 4**). Les deux valves sont jointes par un ligament charnière et un muscle adducteur postérieur (**Figure 4**).

Le corps de l'animal est enveloppé dans le manteau, qui assure la croissance coquillière et délimite la cavité palléale. Les branchies, constituées de quatre feuillet lamellés qui s'étendent le long du manteau sur la partie dorsale, assurent une double fonction de respiration et de nutrition.

Au niveau de la région antérieure, quatre palpes labiaux vont réaliser le tri des particules, acheminées ultérieurement à la bouche. Les autres constituants de l'appareil digestif (un estomac, une glande digestive, un intestin et un anus) sont inclus dans la masse viscérale localisée en partie dorsale.

En période de reproduction, une gonade se forme autour de cette masse viscérale. Le cœur se situe entre la masse viscérale et le muscle, il est composé d'un ventricule et de deux oreillettes. Dans la présentation de nos travaux lorsque nous parlerons de glande digestive, il s'agira en réalité de la totalité de la masse viscérale.

1.3.2. Les systèmes circulatoire, nerveux, respiratoire et digestif

Le système circulatoire est semi-ouvert (Cheng 1981, **Figure 4**). L'hémolymphe¹⁴ est propulsée par le ventricule et collectée par des sinus, est ensuite épurée par le rein, puis circule dans les branchies par les vaisseaux afférents et en repart, après hématoxyse, par les vaisseaux efférents jusqu'aux oreillettes.

¹⁴ Hémolymphe: fluide circulatoire chez les invertébrés, généralement incolore

Le système nerveux, symétrique par rapport au plan sagittal, est constitué de ganglions. Les sécrétions sont de type aminergique (sérotonine, dopamine) et peptidergique.

Le système respiratoire est localisé au niveau des branchies. L'huître ne possède pas d'hémocyanine ou d'hémoglobine. L'oxygène dissous dans l'eau de mer est alors extrait et transporté sous forme dissoute dans l'hémolymphe, des branchies vers les organes.

Les branchies assurent également les fonctions de nutrition. *C. gigas* est un organisme suspensivore¹⁵ et la filtration de 25 à 150 litres d'eau par jour assure la capture puis le triage des particules alimentaires (organismes planctoniques et principalement algues phytoplanctoniques) qui sont dirigées vers la bouche. Les particules de taille supérieure à 10 µm sont englobées de mucus et rejetées sous la forme de pseudo-fécès¹⁶. Les branchies participent ainsi à l'excrétion de certains déchets. *C. gigas* peut aussi absorber des substances dissoutes présentes dans l'eau de mer par pinocytose¹⁷ (lipides).

La fécondation de cet organisme hermaphrodite¹⁸ protandre¹⁹ est externe, et sur la côte Atlantique, la reproduction a lieu durant l'été. Suite à la fécondation, les larves vont dériver avec la masse d'eau pendant environ trois semaines avant de se métamorphoser en jeunes individus, et se fixer sur le substrat. A ce stade, ils sont appelés naissains (**Figure 4**).

1.4. L'ostréiculture

En ostréiculture, les naissains²⁰ sont obtenus de trois façons différentes : 1) en installant des collecteurs dans le milieu naturel où les naissains sauvages d'huître peuvent se fixer, 2) en éclosion²¹ ou 3) par télécaptage²². Par la suite, ils sont cultivés selon différentes

¹⁵ Suspensivore: organisme qui se nourrit de la matière en suspension dans l'eau

¹⁶ Pseudo-fécès : particules enrobées de mucus et expulsées hors de l'organisme avant même d'avoir été digérées

¹⁷ Pinocytose: intégration d'une gouttelette de liquide du milieu extracellulaire par une cellule

¹⁸ Hermaphrodite: être vivant portant les organes reproducteurs des deux sexes, mâle et femelle

¹⁹ Protandre: organisme à hermaphroditisme successif, de sexe mâle au début de son existence

²⁰ Naissains : terme utilisé pour les larves d'huîtres ou moules qui se fixent sur un support, et pour les jeunes huîtres fixées, d'âge inférieur à un an (avant d'atteindre la maturité sexuelle)

²¹ Eclosion : établissement aquacole, dulcicole ou marin, dans lequel est réalisé le premier stade de l'élevage, à savoir la production de juvéniles, naissains dans le cas des huîtres, alevins dans le cas des poissons

²² Télécaptage : captage de naissain en milieu naturel, à partir de larves issues d'éclosion

méthodes, en fonction des caractéristiques du milieu : culture à plat, en suspension ou en surélévation (**Figure 6**).

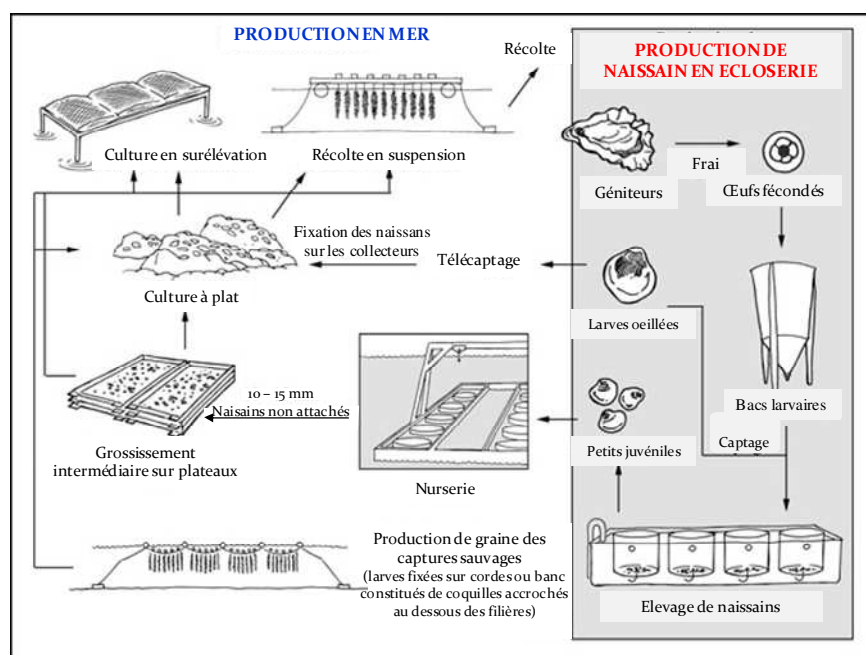


Figure 6 Cycle de production de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Les naissains sont obtenus 1) par captage des naissains sauvages d'huître se font à l'aide de collecteurs 2) par production de naissain en écloserie ou 3) par télécaptage de larves d'huîtres provenant d'une écloserie. Ils sont ensuite cultivés en réalisant une culture à plat, en suspension ou en surélévation, comme indiqué sur la figure. Source : FAO, 2010.

Une des méthodes la plus employée actuellement pour augmenter les rendements de production consiste à induire la triploïdie (Piferrer *et al.* 2009). La triploïdie peut être obtenue par induction chimique ou par croisement, cette dernière étant considérée comme moins nocive et plus efficace. Les huîtres triploïdes obtenues possèdent trois jeux de chromosomes haploïdes ($3n$) et sont supposées être stériles. Ainsi, l'énergie qui devrait être allouée à la reproduction serait allouée à d'autres fonctions telles que la croissance.

1.5. Les mortalités estivales

En ostréiculture, différents cas de mortalité ont été rapportés dans le monde entier, et généralement, surgissent suite à l'infection par un agent pathogène (Elston 1993). La majorité, voire la totalité de l'élevage de bivalves tels que *C. gigas* s'effectue en milieu ouvert (**Figure 4**). Or, ce type d'élevage ne permet aucun contrôle de la qualité de l'environnement (propriétés physico-chimiques de l'eau, présence de contaminants, quantités d'alimentation) et rend l'application de traitements chimiques impossible. De plus, aucun vaccin efficace n'a été développé jusqu'à présent chez les mollusques. Ainsi,

une solution pour l'ostréiculteur est de remplacer l'espèce touchée par une espèce plus résistante.

En France, par exemple, *C. angulata* a été introduite au XXI^{ème} siècle et a remplacé presque totalement la culture de l'huître endémique *O. edulis*, suite à une épizootie de cette dernière, vers les années 1920 (**Figure 4**). Cependant, cinquante ans plus tard, deux épizooties successives ont décimé les populations de *C. angulata*. Ainsi vers les années 1970, *C. gigas* a été introduite. Chez *C. gigas*, les premières observations des mortalités dites « estivales », car ayant lieu en période estivale, ont été signalées au Japon (Imai *et al.* 1965), aux Etats-Unis (Cheney *et al.* 2000) et en Europe (Gouletquer *et al.* 1998). En France, ces épisodes sont apparus dès l'introduction de *C. gigas*, et touchent les adultes mais surtout les jeunes stades de vie. Ces phénomènes constituent un sujet préoccupant pour la profession ostréicole, car aucune autre espèce ne serait disponible pour compenser la perte de *C. gigas*.

De plus, à la différence d'autres cas chez d'autres espèces ostréicoles, les mortalités de *C. gigas* seraient dues à une étiologie²³ multifactorielle (Samain 2007), associée à :

- des **facteurs environnementaux** (température de l'eau >19°C, pluviométrie, associée aux apports d'eau douce et aux substances véhiculées telles que les nutriments et les contaminants)
- des **pratiques culturelles** (une densité trop importante dans les sites d'élevage, ou la proximité des huîtres au sédiment)
- l'**état physiologique** (les mortalités ont lieu à un état de maturation gonadique avancé, généralement au moment de la reproduction, évènement qui semblerait être accompagné d'une diminution des capacités de défense)
- un **déterminisme génétique** (des familles qui sembleraient résister plus aux mortalités, appelées « R », par rapport à des familles plus sensibles, appelées « S »)
- des **agents pathogènes virulents** (la présence d'un virus apparenté à la famille des *Herpesviridae*, Ostreid Herpesvirus type 1 (OsHV-1) et les bactéries du genre *Vibrio*, appartenant principalement à deux espèces *Vibrio splendidus* et *V. aestuarianus*, a souvent été associée aux épisodes de mortalité)

²³ Etiologie : Causes et facteurs d'une maladie

Ces mortalités sont caractérisées aussi comme étant très variables dans leur intensité en fonction des sites étudiés, des années considérées et de l'âge des animaux cultivés (Samain 2007).

A partir de 2008, des mortalités qualifiées d'« anormales » atteignent des taux de mortalité jusqu'à 100% pour certains lots d'huîtres, et touchent notamment la classe d'âge inférieure à 18 mois. Les conséquences économiques et sociales sont alarmantes et remettent en cause aujourd'hui la pérennité de cette activité ostréicole. Il est intéressant de noter que des températures inférieures à 19°C ont été enregistrées au cours des épisodes de mortalité des années 2008 à 2010, et un nouveau génotype de l'herpès virus OsHV-1, appelé OsHV-1 μ var, a été détecté. De plus, une étude d'épidémiologie descriptive a mis en évidence un gradient d'apparition des mortalités orienté du Sud au Nord, débutant en Mer Méditerranée, puis sur la côte Atlantique, en Bretagne et enfin en Normandie (Miossec *et al.* 2009; **Figure 7**).



Figure 7 Evolution de la mortalité des naissains d'huîtres en 2010. Selon le forum du site Ostrea, l'Ifremer et l'Office International de l'Eau (OIE). Les mortalités de 2007 à 2010 sont caractérisées par un gradient orienté du Sud au Nord, débutant en Mer Méditerranée, et allant, sur la côte Atlantique, jusqu'en Normandie.

Cependant, aucun symptôme prédictif de mortalité n'a aujourd'hui été caractérisé chez l'huître empêchant toute surveillance en amont de l'état de santé des populations. Le recours à des tests non spécifiques témoignant de façon fiable de l'état de santé général du lot concerné (comme des tests d'évaluation des réactions à différents types de stress) peut constituer une méthode d'intérêt permettant de révéler une fragilité physiologique de l'animal ou un agent infectieux non détectable *a priori*.

2. Les mécanismes de défense chez *Crassostrea gigas*

Dans le cadre de cette thèse, le terme 'mécanismes de défense' regroupe les principaux mécanismes mis en place par l'organisme, de façon spécifique ou non, en réponse à la présence et/ou à l'effet de contaminants chimiques dans le milieu, à savoir 1) les mécanismes de défense immunitaire, 2) les mécanismes de défense contre le stress oxydant et 3) les mécanismes de détoxification des xénobiotiques²⁴. Les protections mécaniques, première barrière empêchant l'entrée des contaminants au sein de l'organisme, seront présentées également dans cette partie.

2.1. Protections mécaniques

Tout d'abord, les huîtres possèdent des protections mécaniques contre les agressions extérieures : la coquille, le manteau et une couche de mucus au niveau des branchies (Auffret 2003). Ainsi, quand les tentacules disposés le long du manteau détectent un danger, la coquille se ferme. Quand la coquille est ouverte, les branchies font office de filtre, et grâce à une couche de mucus, elles peuvent rejeter des particules minérales de grande taille (> 10 µm). Lorsque les agressions dépassent ces barrières physiques, des mécanismes de défense biologique se mettent en place.

²⁴ Xénobiotique: substance chimique introduite dans l'organisme, où elle n'est ni synthétisée ni utilisée, qui après pénétration, à une dose relativement élevée en une ou plusieurs fois très rapprochées, ou par petites doses longtemps répétées, peut provoquer immédiatement ou à terme, de façon durable ou passagère, des troubles d'une ou de plusieurs fonctions de l'organisme pouvant aller jusqu'à leur suppression complète, et entraîner la mort

2.2. La reconnaissance du non-soi

Chez les vertébrés, il existe deux types de réponse immunitaire : la réponse immunitaire non spécifique ou innée et la réponse immunitaire spécifique, adaptative ou acquise. Le système immunitaire des organismes invertébrés repose principalement sur la réponse immunitaire innée. En effet, ces organismes sont dépourvus de lymphocytes et d'anticorps. Ils ne possèdent donc pas de mémoire immunitaire, et ne sont donc pas considérés comme ayant une réponse immunitaire adaptative.

Néanmoins, les invertébrés possèdent des protéines de reconnaissance de motifs du non soi, les PRP (Pattern Recognition Protein), qui vont reconnaître des motifs présents à la surface des microorganismes, les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns). La reconnaissance des PAMP par les PRP induit par la suite l'activation de la réponse immunitaire innée.

Plusieurs PRP connues chez les vertébrés ont été identifiées chez des mollusques comme *C. gigas*. Chez cette espèce, ont été caractérisées :

- des protéines de **reconnaissance des lipopolysaccharides** (LPS) des bactéries Gram(-) telles que la *Cg-LBP* (*Crassostrea gigas* LPS-binding protein) et la *Cg-BPI* (Bactericidal/Permeability Increasing protein) (Gonzalez 2005)
- des protéines de **reconnaissance des sucres** appelées lectines, telles que les gicalines E et H (Olafsen *et al.* 1992)

Chez d'autres espèces d'invertébrés, des protéines de **reconnaissance de peptidoglycanes** des bactéries Gram(+) appelées PGRP (peptidoglycanes recognition proteins) ont également été rapportées (Yoshida *et al.* 1996).

2.3. La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée repose sur des mécanismes de défense à médiation cellulaire et à médiation humorale (**Tableau 1**). Ces deux types de réponse immunitaire peuvent agir de façon indépendante ou conjuguée (Hultmark 2003, Dimopoulos 2003, Brennan & Anderson 2004).

Tableau 1 Le système immunitaire inné chez *Crassostrea gigas*

Immunité innée à médiation cellulaire	Immunité innée à médiation humorale
<p>Infiltration (Feng 1988) :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Infiltration du lieu lésé ou infecté par de nombreux hémocytes qui se concentrent sur le site de lésion ou d'infection. 2) Formation d'un amas par des hémocytes agrégés. 3) Remplacement des tissus endommagés par des hémocytes allongés. 4) Dépôt de collagène. 5) Elimination des tissus nécrotiques par des hémocytes phagocytaires et restauration de l'architecture normale du tissu. 	<p>Enzymes hydrolytiques (Feng 1988) :</p> <p>Elles sont responsables de la lyse intra- ou extracellulaire (lysozyme, β-glucuronidase, phosphatases acide et alcaline, sérine protéase, amylase, lipase)</p>
	<p>Inhibiteurs de protéases (Faisal <i>et al.</i> 1998 ; Montagnani <i>et al.</i> 2001 ; Gueguen <i>et al.</i> 2003) :</p> <p>Les inhibiteurs de protéases évitent l'activation excessive de cascades protéolytiques endogènes ou participent à l'inhibition des protéases permettant aux pathogènes de pénétrer et de proliférer dans l'hôte.</p>
<p>Phagocytose (Feng 1988 ; Olafsen <i>et al.</i> 1992) :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Reconnaissance de l'organisme comme étranger (non-soi) par l'intermédiaire de récepteurs et de lectines. 2) Adhésion de la particule étrangère sur l'hémocyte et contraction du cytosquelette permettant à la membrane cytoplasmique d'englober la particule étrangère. 3) Internalisation de la particule dans le cytoplasme de l'hémocyte sous la forme d'un phagosome qui fusionne avec un ou plusieurs lysosomes pour former le phagolysosome 4) Destruction de la particule par des enzymes lysosomales ou par des espèces réactives de l'oxygène. 5) Les produits de dégradation de la particule sont soit utilisés par la cellule (accumulés dans des vacuoles sous forme de pigments tels que la mélanine), soit libérés dans le milieu extracellulaire par l'intermédiaire de vésicules. 	<p>Protéines de stress (heat shock proteins) (Boutet <i>et al.</i> 2003) :</p> <p>Ces protéines permettent d'accroître la capacité des cellules à supporter les variations de l'environnement.</p>
	<p>Molécules cytotoxiques, peptides antimicrobiens et activités anti-virales (Bachère <i>et al.</i> 1990 ; Montagnani <i>et al.</i> 2001 ; Gueguen <i>et al.</i> 2003 ; Olicard <i>et al.</i> 2005 ; Gueguen <i>et al.</i> 2003, Gonzalez 2005) :</p> <p>Des molécules cytotoxiques, certaines substances physiologiques telles que la transferrine et la lactoferrine ou des peptides antimicrobiens tels que les défensines inhibent les agents pathogènes. Des activités antivirales ont également été rapportées chez <i>C. gigas</i>.</p>
	<p>Enzymes antioxydantes (Neumann <i>et al.</i> 2001) :</p> <p>Ces enzymes interviennent dans les mécanismes de défense contre les espèces réactives de l'oxygène.</p>
<p>Encapsulation (Feng 1988) :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Les agents pathogènes métazoaires (trématodes, cestodes) de grande taille ne peuvent pas être phagocytés, et sont alors entourés d'une couche interne constituée de cellules comparables à des fibroblastes et d'une couche externe constituée de matériel fibreux contenant des glycoprotéines et/ou des mucoprotéines et infiltrée par des hémocytes. 2) La destruction du pathogène serait due à la β-glucuronidase. 	<p>NO synthase (Arumugan <i>et al.</i> 2000) :</p> <p>La NO (oxyde nitreux) synthase catalyse la production d'oxyde nitreux qui intervient en tant qu'agent anti-bactérien et anti-tumoral.</p>
	<p>Système phénoloxydase-phénoloxydase (Söderhäll & Cerenius 1998) :</p> <p>La phénoloxydase activée catalyse la réaction de conversion de substances phénoliques en mélanine ; les composés intermédiaires de cette réaction sont bactéricides et interviennent dans les phénomènes de reconnaissance du non-soi.</p>

2.3.1. La réponse immunitaire innée à médiation cellulaire

Les mécanismes de défense à médiation cellulaire connus à ce jour chez les mollusques bivalves reposent essentiellement sur les hémocytes, cellules circulantes présentes dans l'hémolymphe. Chez ces organismes, on distingue deux classes d'hémocytes (**Figure 8** ; Bachère *et al.* 1988, Bachère *et al.* 2004) : 1) les hyalinocytes, une population d'hémocytes sans granules et 2) les granulocytes, une population d'hémocytes à granules.

Les hémocytes sont capables de migrer dans tous les tissus de l'animal où ils jouent des fonctions multiples associées à des processus vitaux tels que la respiration, la digestion, le transport des nutriments, l'excrétion, les réactions de défense, la réparation de lésions et de la coquille (Feng 1988, Cheng 1996, Auffret 2003).

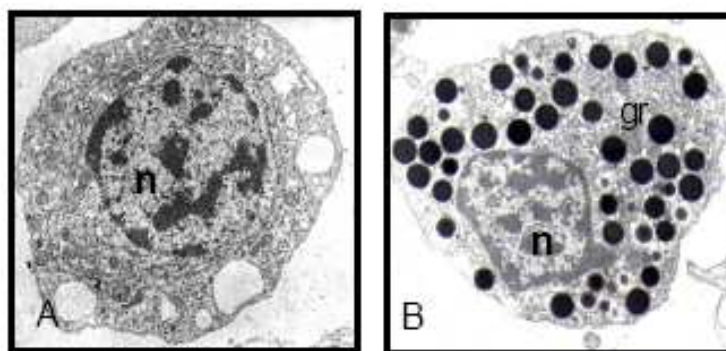


Figure 8 Types hémocytaires chez *Crassostrea gigas* **A.** Hyalinocytes, caractérisés par un rapport nucléocytoplasmique élevé et une absence de granules de grande taille dans le cytoplasme. **B.** Granulocytes : caractérisés par un rapport nucléocytoplasmique faible et une grande quantité de granules denses aux électrons. n : noyau ; gr : granules (agrandissement x 15 000) (d'après Bachère *et al.* 2004).

La réponse immunitaire mise en place par les hémocytes repose essentiellement sur les mécanismes :

- **d'infiltration** : suite à une infection, à un dommage causé par des substances toxiques ou à une blessure, une élévation de la densité hémocytaire (ou hémocytose) a lieu dans le système circulatoire. Les hémocytes sont ensuite véhiculés par l'hémolymphe vers le site affecté, dans le but de s'agréger et de limiter l'infection ou la lésion.

- **d'encapsulation** : les agents pathogènes de grande taille, tels que les trématodes ou les cestodes, sont entourés d'une couche cellulaire (**Figure 9**). La formation des capsules d'origine hémocytaire a été étudiée chez l'huître *C. virginica* (Cheng 1996) et les palourdes *Tapes semidecussatus* (Montes *et al.* 1995) et *Mercenaria mercenaria*

(Smolowitz *et al.* 1998), mais aucune étude n'a été réalisée à notre connaissance chez *C. gigas*.

- de **phagocytose** : la phagocytose contribue à l'élimination d'éléments de petite taille. La première étape de la phagocytose est la reconnaissance des particules étrangères par des PRP à la surface des hémocytes. Suivent les étapes d'attachement sur les hémocytes, d'internalisation dans le cytoplasme, de dégradation des particules étrangères, puis d'élimination des produits de dégradation (Bayne 1990 ; **Figure 9**). Ces phénomènes ont été observés dans les hémocytes de plusieurs mollusques (Cheng 1981).

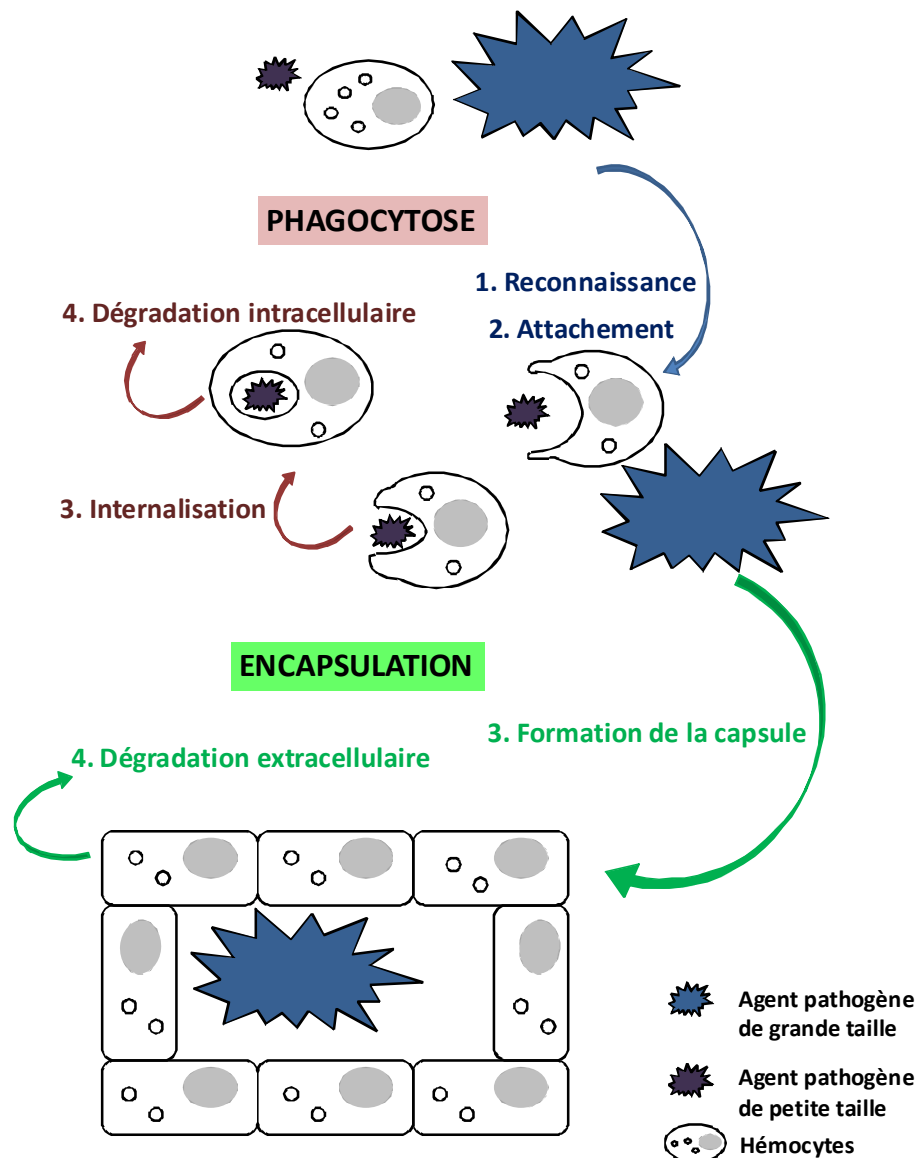


Figure 9 Les processus de phagocytose et d'encapsulation

D'autres processus cellulaires semblent jouer également un rôle important dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire chez *C. gigas* :

- Un mécanisme d'**apoptose cellulaire** peut se mettre en place chez *C. gigas* dans le but de réguler les populations cellulaires dans un contexte physiologique, mais aussi pathologique (Renault *et al.* 2000, Sunila & LaBanca 2003).
- Des séquences présentant de fortes homologues avec des protéines intervenant dans les processus de **contact, d'adhésion, de communication cellulaire et d'amplification** de la réponse immunitaire chez les vertébrés telles que les intégrines et les cytokines de mammifères ont également été identifiées chez *C. gigas*, mais aucune activité fonctionnelle n'a été démontrée jusqu'à présent (Gueguen *et al.* 2003, Tanguy *et al.* 2004).
- Puis, chez les invertébrés, la **dégranulation** des hémocytes permet de libérer des protéines intervenant dans les mécanismes de défense telles que les agglutinines, les péroxinectines, des enzymes cytolitiques, les enzymes du système pro-phénoloxydase (proPO) et les peptides antimicrobiens dans l'hémolymphe ou sur le site de l'infection ou de la blessure (Söderhäll & Cerenius 1998, Cerenius *et al.* 2008). Ces protéines jouent également un rôle dans les mécanismes de défense à médiation humorale.

2.3.2. La réponse immunitaire innée à médiation humorale

La réponse immunitaire innée à médiation humorale fait intervenir de nombreuses molécules dans la lutte contre les agents pathogènes, les toxines ou les contaminants :

- Les **molécules cytotoxiques**, les **peptides antimicrobiens** et les **molécules antivirales** : des séquences de molécules cytotoxiques de type transferrine et lactoferrine sont présentes dans les banques EST²⁵ d'hémocytes de *C. gigas* (Gueguen *et al.* 2003). Un peptide antimicrobien de type défensine, *Cg-def*, a été identifié chez l'huître creuse *C. gigas* et est principalement exprimé au niveau du bord du manteau (Gueguen *et al.* 2003, Gonzalez 2005). Certains auteurs ont également mis en évidence chez cette espèce la présence de molécules et de mécanismes antiviraux (Bachère *et al.* 1990, Olicard *et al.* 2005).
- Les **enzymes hydrolytiques** (lysozyme, β -glucuronidase, phosphatases acide et alcaline, sérine protéase, amylase, lipase) : elles sont présentes sous forme libre dans le

²⁵ EST : Un marqueur de séquence exprimée ou expressed sequence tag est une courte portion séquencée d'un ADN complémentaire. Il est utilisé pour différencier les gènes entre eux dans une séquence d'ADN. Il permet d'identifier des gènes homologues dans d'autres espèces.

plasma ou bien sont contenues dans les lysosomes des hémocytes et sont impliquées dans la lyse intra- ou extracellulaire (Xue & Renault 2000). Parmi ces protéines, le lysozyme (EC 3.2.1.17, 1,4-N-acétylmuramidase C), est une enzyme bactériolytique, lysant les liaisons β -1,4-glucosidiques des peptidoglycane, constituants essentiels de la paroi des bactéries Gram-(+) (**Figure 10**).

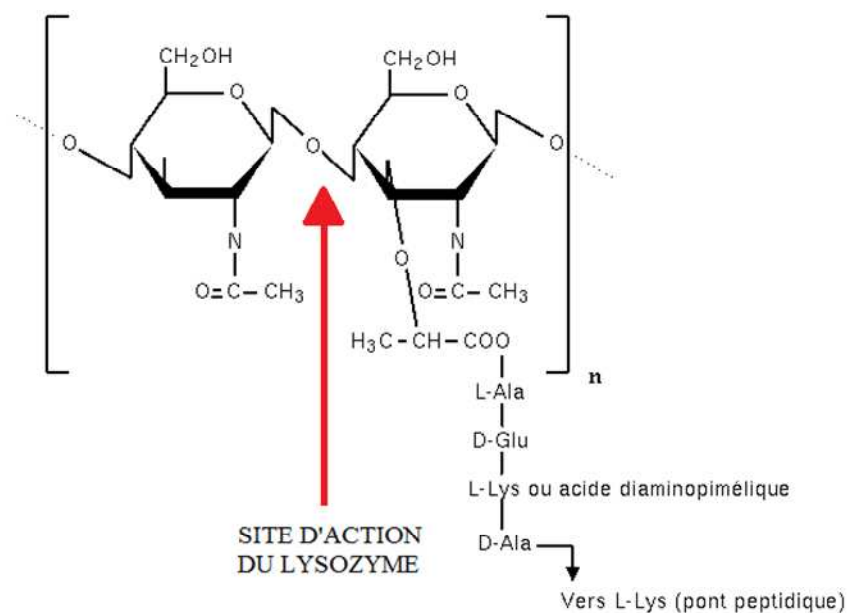


Figure 10 Site d'action du lysozyme sur les peptidoglycane des parois bactériennes

- Le stress oxydant et les **enzymes antioxydantes** : lorsqu'un agent pathogène est phagocyté, l'activation du métabolisme oxydatif des cellules phagocytaires peut conduire à un stress oxydant. L'activation de la NADPH-oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase) membranaire conduit à une augmentation de la consommation d'oxygène et à la surproduction de radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule, tels que l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (O) ou l'anion hypochlorite (ClO). Les ROS ont de forts pouvoirs microbicides et sont impliqués dans la destruction microbienne par des effets toxiques (Babior 1984). Le contenu en ROS dans l'organisme est régulé par des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (**Figure 11** ; Neumann *et al.* 2001). Chez *C. gigas*, un effet inhibiteur des capacités métaboliques oxydatives a été mis

en évidence après incubation des hémocytes avec des produits extracellulaires de *V. aesturianus*, révélant un effet cytotoxique de ces bactéries (Labreuche *et al.* 2006).

- L'oxyde nitreux synthase ou **NO synthase** : elle catalyse la production d'oxyde nitreux qui intervient en tant qu'agent anti-bactérien et anti-tumoral (Arumugan *et al.* 2000). L'oxyde nitreux combiné avec les anions superoxyde produits lors de la phagocytose génère l'anion peroxyntrique (ONOO[•]), composé labile, fortement toxique (**Figure 11**). Ce système de défense a été décrit chez *C. gigas* (Arumugan *et al.* 2000).

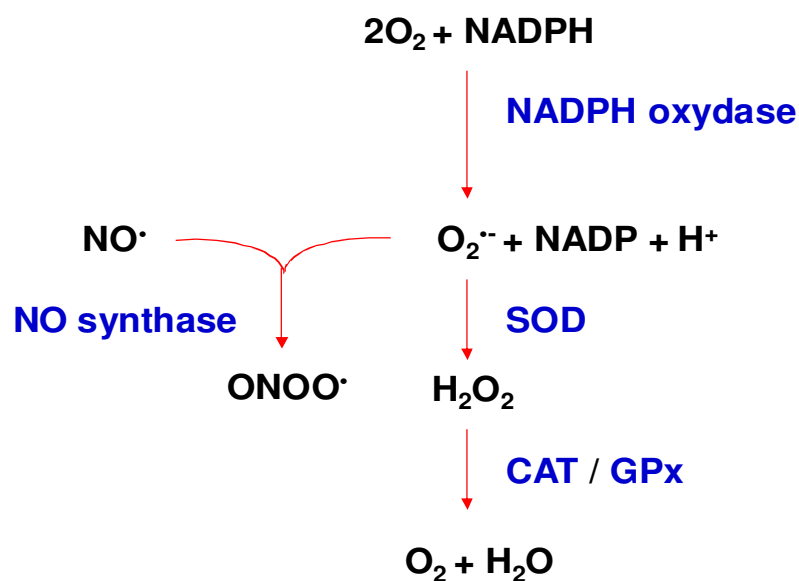


Figure 11 Le stress oxydant et les enzymes antioxydantes. NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; SOD : superoxyde dismutase ; CAT : catalase ; GPx : glutathion peroxydase ; NO : monoxyde d'azote ; ONOO : peroxyntrite.

- Les **protéines de stress** (en anglais, heat shock proteins, HSP) : les HSP permettent d'accroître la capacité des cellules à supporter les variations de l'environnement, telles que la température ou la salinité (Boutet *et al.* 2003), et interviennent également lors de blessures, infections et expositions à des molécules toxiques (Choi *et al.* 2008).

- Les **inhibiteurs de protéases** : ils évitent l'activation excessive de cascades protéolytiques endogènes telles que celles des protéases à sérines (ou sérine protéases), intervenant dans l'activation du système proPO. Ils peuvent aussi agir comme des effecteurs directs des mécanismes de défense, en inhibant des protéases permettant aux

pathogènes de pénétrer et de proliférer dans l'hôte (e.g., les inhibiteurs de métalloprotéases (TIMP) ; Montagnani *et al.* 2001). Des ADNc codant pour des protéines de type α -2-macroglobuline, des serpines et des TIMP ont été rapportées chez l'huître creuse, *C. gigas* (Faisal *et al.* 1998, Gueguen *et al.* 2003).

- Le **système prophénoloxydase (proPO)** : Chez les invertébrés, la PO est présente sous une forme inactive, prophénoloxydase (proPO). Le système proPO correspond à la cascade biochimique responsable de l'activation des PO (Söderhäll & Cerenius 1998). Certains PAMP peuvent stimuler le clivage protéolytique de la pro-PO en PO (**Figure 12**). Suite à l'activation de la PO, cette enzyme catalyse l'oxydation de différents composés, principalement phénoliques, en quinones. Ces molécules peuvent à leur tour être polymérisées de façon non enzymatique en mélanine (**Figure 12**). Le mécanisme d'activation du système proPO chez les invertébrés a été comparé dans le passé à d'autres mécanismes d'activation de cascades impliquées dans les mécanismes de défense telles que la cascade Toll, présente chez de nombreux invertébrés, ou la cascade de coagulation du sang et le système du complément chez les mammifères (Alan *et al.* 1998). Chez *C. gigas*, une activité PO a été détectée dans l'hémolymphe (Luna-González *et al.* 2003, Hellio *et al.* 2007) et à différents stades de développement mais son rôle reste inconnu (Thomas-Guyon *et al.* 2009).

2.4. Présence d'une réponse immunitaire adaptative chez *C. gigas* ?

La présence de récepteurs spécifiques comme les PRP (pathogen recognition proteins) (Rowley & Powell 2007), puis, l'identification du phénomène de sensibilisation²⁶ (en anglais, priming), sembleraient indiquer la présence d'une réponse spécifique chez les invertébrés (Rowley & Powell 2007). De plus, la protéine de la cascade du complément C3, considérée comme faisant partie de l'immunité innée mais jouant également un rôle dans l'immunité adaptative chez les invertébrés, a été identifiée récemment chez la palourde *Tapes (= Ruditapes) philippinarum* (Prado-Alvarez *et al.* 2009). Cependant, aucune étude à notre connaissance n'a été réalisée sur ces aspects chez *C. gigas*.

²⁶ Sensibilisation: Suite à l'exposition répétée d'une situation stimulante et à l'inverse de l'habituation, le priming (ou sensibilisation) correspond à une augmentation de la réponse d'alerte.

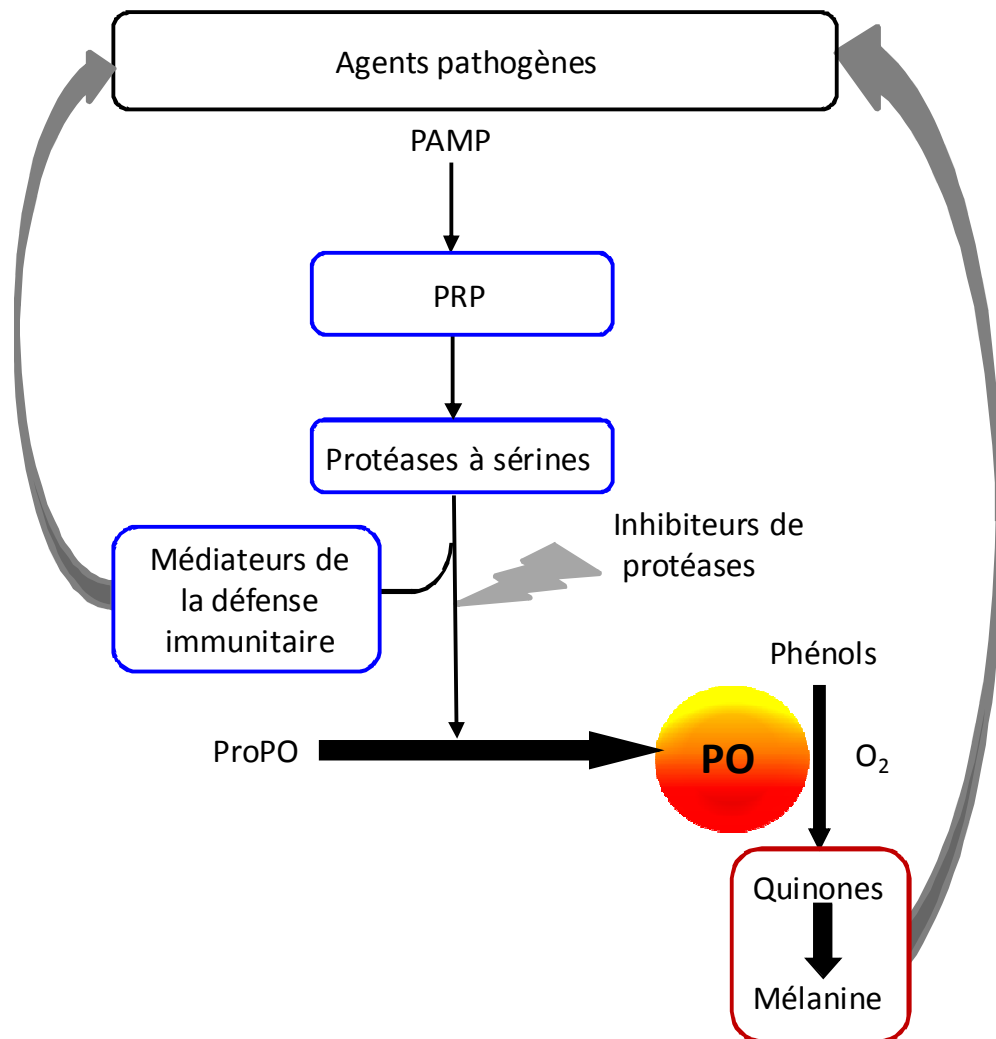


Figure 12 Activation du système prophénoloxydase (proPO) chez les invertébrés. Modifié de Söderhäll & Cerenius 1998. Des motifs moléculaires associés à des pathogènes (PAMP) sont reconnus par des protéines de reconnaissance de l'hôte (PRP). Ainsi, une cascade d'activation de protéases à sérines est initiée et mène à la conversion du zymogène proPO en PO. En présence d'O₂, les PO catalysent la transformation de composés phénoliques en quinones qui vont être transformées de façon non enzymatique en différents intermédiaires instables. Ces derniers vont polymériser en mélanine. La mélanine et les quinones intermédiaires sont des produits cytotoxiques et d'encapsulation du pathogène.

2.5. La réponse aux xénobiotiques

Afin de se protéger face aux agressions cellulaires par les xénobiotiques toxiques, des réactions enzymatiques pour modifier le xénobiotique se mettent en place (Parant 1998) :

- Les **enzymes de phase I** : elles rendent le xénobiotique plus réactif, *via* une réaction de monooxygénation (introduction d'un atome d'oxygène), facilitant par la suite sa métabolisation (**Figure 13**). Cette phase fait intervenir les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP) et à flavine (FMO) ainsi que d'autres composants (cytochrome b5, cytochrome b5 réductase, cytochrome c réductase, NADPH, NADH). Tous ces composés ont été détectés dans la glande digestive, les branchies ou les hémocytes des bivalves (Livingstone *et al.* 1989, Schlenk & Buhler 1989, Porte *et al.* 2006).

- Les **enzymes de phase II** : elles rendent le xénobiotique entrant dans la cellule, ou préalablement modifié par les enzymes de phase I, plus soluble en formant un composé hydroxyle ayant une propriété hydrosoluble (**Figure 13**). Ces enzymes sont les glutathion-S-transférases (GST), les UDP-glucuronosyltransférases (UDPGT), les sulfotransférases (ST) et les époxydes hydrolases (EH). Ces enzymes ont été identifiées dans la glande digestive mais pas dans les hémocytes de *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* et la moule zébrée, *Dreissena polymorpha* (Parant 1998).

- Les **enzymes de phase III** : elles regroupent les protéines membranaires qui vont expulser hors de la cellule le xénobiotique modifié par les enzymes de phase I et/ou II (**Figure 13**). La présence d'une protéine membranaire similaire à la Gp170 (Gp170-like) intervenant dans le mécanisme MXDM (mécanisme de défense multixénobiotique, en anglais multi xenobiotic defense mechanism), et agissant sur les xénobiotiques non modifiés chez les vertébrés, a été mise en évidence chez différentes espèces de bivalves (Parant 1998). L'amplification du gène *mdr-1* a pu être réalisée chez la larve véligère et le naissain de *C. gigas* (Minier *et al.* 2002).

- Les **métallothionéines (MT)** : les MT se lient principalement aux métaux afin de prévenir leur diffusion vers l'extérieur (Simkiss *et al.* 1982). Chez *C. gigas*, ainsi que chez d'autres bivalves marins, la MT est utilisée pour évaluer l'exposition de l'organisme aux métaux (Tanguy *et al.* 2001, 2002).

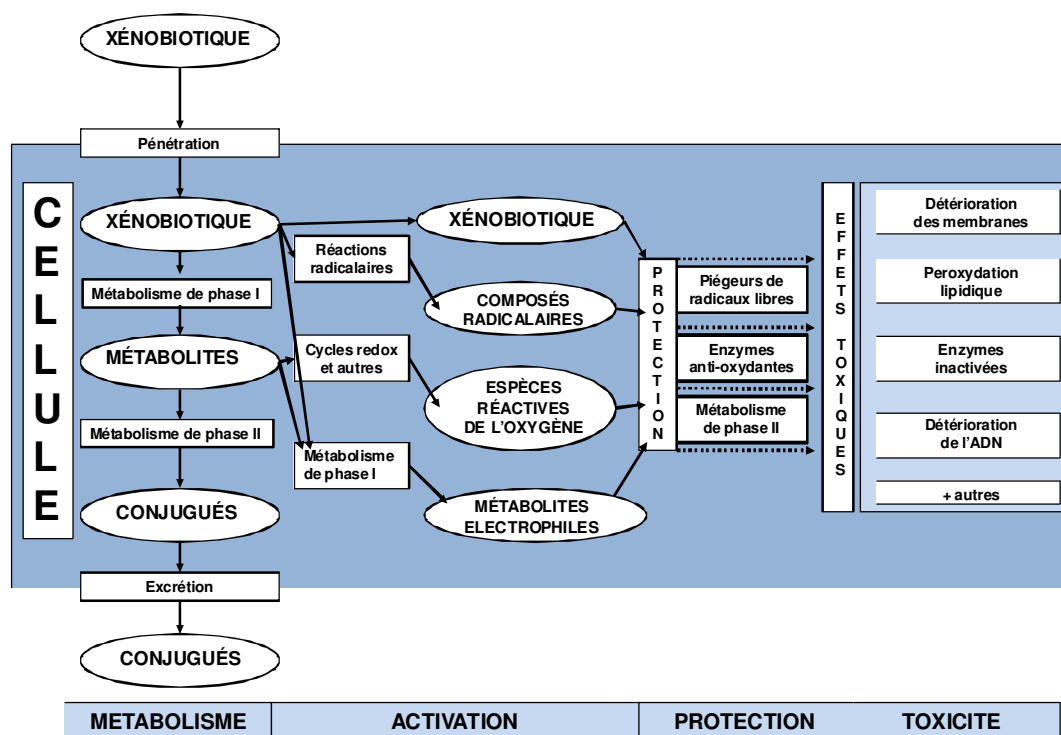


Figure 13 Voies majeures conduisant à la détoxification et à la toxication des xénobiotiques organiques. Modifié de Lagadic *et al.* 1997.

3. Contaminants affectant les mécanismes de défense chez *Crassostrea gigas*

3.1. Pesticides

Parmi les pesticides, les **herbicides** de type phénylurée, de la famille des urées substituées, constituent les herbicides les plus utilisés en agriculture. Ils peuvent aussi être utilisés comme algicides dans les peintures anti-fouling²⁷. Leur mode d'action consiste à inhiber le transport des électrons au niveau de la photosynthèse (photosystème II) (Dodge 1989). Parmi ces herbicides, le diuron et l'isoproturon ont été classés par la 'Directive Cadre sur l'Eau' 2000/60/CE (DCE) comme des substances à étudier de manière prioritaire, car ce sont des carcinogènes, et des perturbateurs endocriniens et reproducteurs. Différentes études ont révélé que ces herbicides modulent différents paramètres impliqués dans les mécanismes de défense immunitaire chez *C. gigas*

²⁷ Peinture anti-fouling ou anti-salissure : peinture contenant des substances toxiques et destinée à empêcher les organismes marins de se fixer, par exemple, sur la coque des navires.

(**Tableau 2**). Des effets ont été observés également sur la structure de l'ADN (Bouilly *et al.* 2007), la morphologie de l'épithélium du tubule digestif et la reproduction (Buisson *et al.* 2008).

Les **pesticides organochlorés (OCP)**, tels que le dithiothréitol (DDT), le lindane et la dieldrine, sont classés comme des Polluants Organiques Persistants (POP), du fait de leurs caractères toxique, bioaccumulable, mutagène et tératogène. Le DDT est aujourd'hui interdit à la vente. Cependant, il est toujours détecté par le réseau de surveillance ROCCH dans la chair des huîtres. Leurs effets sur *C. gigas* ne sont pas connus.

Les **pesticides organophosphorés**, qui ont remplacé les organochlorés, et les **carbamates**, agissent en inhibant l'acétylcholinestérase (AChE) et les carboxylestérases (CE) (Cooreman *et al.* 1993). Ce type d'insecticides ne semble pas avoir d'effet sur les cholinestérases des branchies de *C. gigas* (Bocquené *et al.* 1997). En revanche, des organophosphorés tels que le glyphosate sont capables de moduler l'expression de gènes impliqués dans différentes fonctions biologiques dont les mécanismes de défense immunitaire (Tanguy *et al.* 2005).

Des **fongicides** tels que le chlorothalonil ont des effets sur différents paramètres hématocytaires chez *C. gigas* (**Tableau 2**).

3.2. Organo-étains

Les organo-étains tels que le tributylétain (TBT) sont des substances de synthèse qui étaient présentes dans les peintures anti-fouling de bateaux. Le TBT est actuellement interdit mais est encore utilisé illégalement. Le TBT inhibe fortement l'activité PO chez la moule *M. edulis*, *in vitro* (Hellio *et al.* 2000). Il a également différents effets sur des paramètres hématocytaires de *C. gigas* (**Tableau 2**).

3.3. HAP

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés chimiques dont la structure des molécules comprend au moins deux anneaux aromatiques fusionnés, chacun

composé de cinq ou six atomes de carbone. Les deux origines majeures sont : 1) la source pyrolytique *via* la combustion incomplète de la matière organique à haute température (par les éruptions volcaniques, la combustion du carburant automobile, du charbon ou du bois, entre autres), aboutissant à leur émission dans l'atmosphère, et 2) la source pétrogénique due aux déversements naturels ou d'origine anthropique de pétrole dans le milieu naturel. Certains HAP tels que le naphthalène, l'anthracène et le fluoranthène font partie de la liste des polluants prioritaires de l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (US EPA) et ont été classés par la DCE comme des substances dangereuses prioritaires du fait de leur caractère toxique aigu ou chronique, ou bien de leur effet mutagène (génotoxique) chez les vertébrés et les invertébrés.

Plusieurs travaux sur des bivalves marins dans le milieu naturel ont montré qu'il existe des corrélations entre la teneur en HAP et différentes activités enzymatiques telles que les enzymes liées au cytochrome P450, la NADPH-P450 réductase, la SOD, la CAT et le lysozyme (Porte *et al.* 1991, Sole *et al.* 1994, Fisher *et al.* 2003). De plus, dans des conditions contrôlées de laboratoire, les HAP ont différents effets sur des gènes, des protéines et des cellules impliqués dans les mécanismes de défense chez *C. gigas* (**Tableau 2**).

3.4. PCB

Les PCB représentent une large famille de 209 composés organochlorés de haut poids moléculaire. Ces POP sont extrêmement stables chimiquement, ininflammables, et très peu solubles dans l'eau. Ils sont largement utilisés pour leurs propriétés isolantes comme diélectriques dans les transformateurs et les condensateurs, comme lubrifiants dans les turbines et pompes, ou comme fluide isolant, entre autres.

Les PCB et notamment les PCB 47, 153 et 77 ont des effets sur différents paramètres hématocytaires chez les bivalves marins (Canesi *et al.* 2003). De plus, des corrélations ont été établies sur le terrain entre la présence de PCB et la densité d'hémocytes, le lysozyme, l'activité bactéricide, l'activité β -glucuronidase, la déstabilisation de la membrane des lysosomes et le contenu en GPx chez différents bivalves marins (Sole *et al.* 1994, Fisher *et al.* 2000, Lowe & Fossato 2000, Oliver *et al.* 2001, Oliver *et al.* 2003) Chez *C. gigas*, le PCB 77 diminue le pourcentage de cellules positives aux lysosomes (Gagnaire *et al.* 2006).

Tableau 2 Effet des contaminants organiques sur les mécanismes de défense immunitaire chez *Crassostrea gigas*. ↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; TBT : tributylétain, 2,4D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique ; PCB : polychlorobiphényle.

Mécanisme de défense affecté	Famille de contaminant	Effet observé	Références
Paramètres hématocytaires			
Agrégation hématocytaire	Pesticides (atrazine, diuron, isoproturon)	↓	Auffret & Oubella 1997b
	Organo-étains (TBT)	↓ <i>in vitro</i> / ↑ <i>in vivo</i>	Fisher <i>et al.</i> 1990
Activité de locomotion hématocytaire	Organo-étains (TBT)	↓	Fisher <i>et al.</i> 1990
Mortalité cellulaire	Pesticides (2,4D)	↑	Gagnaire <i>et al.</i> 2006
	Pesticides (chlorothalonil)	↑	Gagnaire <i>et al.</i> 2006
	Pesticides (diuron)	↑	Bouilly <i>et al.</i> 2007
	Pesticides (atrazine, glyphosate, alachlor, metalachlor, fosétyl-aluminum, terbuthilazine, diuron, carbaryl)	↑	Gagnaire <i>et al.</i> 2007
Phagocytose	Pesticides (atrazine, glyphosate, alachlor, metalachlor, fosétyl-aluminum, terbuthilazine, diuron, carbaryl)	↓	Gagnaire <i>et al.</i> 2007
	Pesticides (diuron)	↑	Bouilly <i>et al.</i> 2007
	Hydrocarbures	↓	Jeong & Cho 2005
Pourcentage de granulocytes	Pesticides (chlorothalonil)	↑	Gagnaire <i>et al.</i> 2006
	Pesticides (atrazine, diuron, isoproturon)	↑	Bouilly <i>et al.</i> 2007
	Hydrocarbures (benzo(a)pyrène et phénanthrène)	↑	Gagnaire <i>et al.</i> 2006
Production de ROS	Pesticides (chlorothalonil)	↑	Gagnaire <i>et al.</i> 2006
	Pesticides (atrazine, glyphosate, alachlor, metalachlor, fosétyl-aluminum, terbuthilazine, diuron, carbaryl)	↑	Gagnaire <i>et al.</i> 2007
	Pesticides (diuron)	↑	Bouilly <i>et al.</i> 2007
	Organo-étains (TBT)	↓	Fisher <i>et al.</i> 1990
Présence de lysosomes, de lysozyme ou relargage d'enzymes lysosomales	Pesticides (paraoxon)	↓	Gagnaire <i>et al.</i> 2006
	Pesticides (diuron)	↑	Bouilly <i>et al.</i> 2007
	Polychlorobiphényles (PCB 77)	↓	Gagnaire <i>et al.</i> 2006
	Hydrocarbures (benzo(a)pyrène et phénanthrène)	↓	Gagnaire <i>et al.</i> 2006
Cellules positives pour les estérasés	Pesticides (paraoxon)	↓	Gagnaire <i>et al.</i> 2006
	Hydrocarbures (benzo(a)pyrène et phénanthrène)	↓	Gagnaire <i>et al.</i> 2006

Tableau 2 (suite) Effet des contaminants organiques sur les mécanismes de défense immunitaire chez *Crassostrea gigas*. ↑ : augmentation ; ↓ : diminution.

Mécanisme de défense affecté	Famille de contaminant	Effet observé	Références
Paramètres moléculaires ou protéiques			
Gènes impliqués dans différentes fonctions physiologiques dont les mécanismes de défense immunitaire	Pesticides (mélange d'atrazine, diuron, isoproturon ou glyphosate)	↑ / ↓	Tanguy <i>et al.</i> 2005
Gènes impliqués dans les mécanismes de défense immunitaire	Pesticides (mélange d'atrazine, glyphosate, alachlor, metalachlor, fosétyl-aluminium, terbuthilazine, diuron, carbaryl)	↓	Gagnaire <i>et al.</i> 2007
Gènes impliqués dans différentes fonctions physiologiques dont les mécanismes de défense immunitaire	Hydrocarbures	↑ / ↓	Boutet <i>et al.</i> 2004
Gènes impliqués dans les mécanismes de défense immunitaire dont un gène codant pour une laccase	Hydrocarbures	↑	Bado-Nilles <i>et al.</i> 2010
Phénoloxydase	Hydrocarbures	↓	Bado-Nilles <i>et al.</i> 2010
Paramètres physiologique			
Sensibilité à un challenge bactérien	Pesticide (atrazine, glyphosate, alachlor, metalachlor, fosétyl-aluminium, terbuthilazine, diuron, carbaryl)	↑	Gagnaire <i>et al.</i> 2007

3.5. PBDE et PPSP, des contaminants émergents

Les PBDE sont une suite de 209 produits chimiques bromés différents. Certains PBDE sont ou ont été utilisés comme retardateurs de flamme dans des produits plastiques et textiles. A notre connaissance, leurs effets sur des bivalves tels que *C. gigas* n'ont pas été décrits.

De nombreux PPSP (produits pharmaceutiques neutres et acides, les antibiotiques, les produits de soins personnels tels que les parfums synthétiques à base de musc ou les filtres UV, les médicaments vétérinaires et produits de soins pour animaux) sont éliminés durant le traitement des eaux usées de manière incomplète, faisant qu'ils se retrouvent dans les estuaires et eaux côtières. Récemment, une étude réalisée sur la moule *M. edulis trossulus* exposée à un mélange composé de diclofenac, ibuprofène et propranolol a montré que ces substances avaient un effet sur les capacités de croissance et sur la force d'attachement des filaments du byssus chez cette espèce (Ericson *et al.* 2010). Cependant, aucune étude n'a été faite sur leurs effets au niveau des mécanismes de défense des bivalves et, à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur *C. gigas*.

4. Les biomarqueurs et le stress environnemental

Différents facteurs de stress intrinsèques ou extrinsèques peuvent menacer ou perturber l'équilibre homéostatique des organismes habitant les milieux côtiers (Moore *et al.* 2004b)

Le stress environnemental peut être provoqué par :

- Des **facteurs physico-chimiques** tels que : les radiations UV, l'augmentation du niveau de la mer, les changements climatiques, l'érosion du sol, les variations de la température, de la salinité, de la quantité d'O₂ dissous, de la turbidité ;
- Des **facteurs biologiques** tels que : des interactions entre les animaux comme la prédation, le parasitisme, la compétition pour l'espace, la nourriture ou les partenaires sexuels, les maladies induites par les pathogènes ;

• Des **facteurs anthropiques** tels que : l'industrialisation et la déforestation, la diminution des ressources due par exemple à la sur-pêche, les pratiques aquaculturelles telles que le transport ou la manutention, les perturbations de l'habitat, la contamination d'origine anthropique.

L'organisme peut répondre de différentes façons à ces facteurs de stress. En effet, les réponses peuvent avoir lieu à différents niveaux d'organisation, tels que la cellule, l'organe, l'organisme, la population et l'écosystème (**Figure 14**).

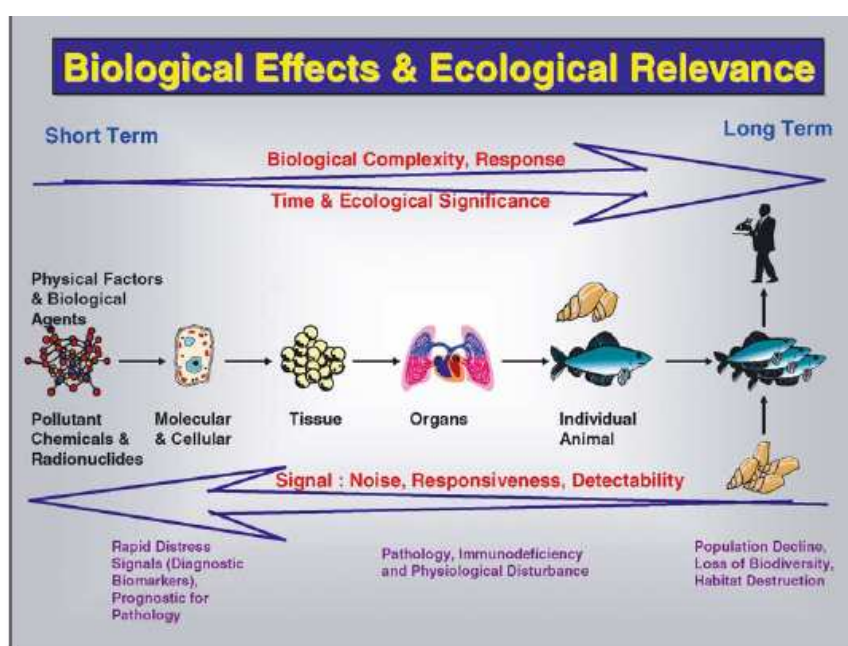


Figure 14 Représentation schématique de la relation entre la détection d'un signal de stress environnemental et la possible signification écologique à long terme. Selon Moore *et al.* 2004b.

L'ensemble de ces réponses est appelé la réponse intégrée aux facteurs de stress (Wendelaar-Bonga 1997). Ainsi, l'animal peut surmonter la menace et maintenir son intégrité *via* des réponses génétiques, métaboliques, physiologiques et/ou comportementales de type compensatoires et/ou adaptatives. Cependant, lorsque l'animal subit un facteur de stress intense, ces réponses peuvent perdre leur valeur adaptative et devenir dysfonctionnelles. Ceci peut provoquer une inhibition de la croissance, un échec de la reproduction ou bien une résistance réduite aux agents pathogènes (Wendelaar-Bonga 1997).

Si un contaminant est nocif pour l'organisme, des interactions moléculaires peuvent se traduire, par exemple, par des variations de paramètres biochimiques. Au-delà d'un

certain seuil dans la dose du contaminant ou de la durée d'exposition, ces changements biochimiques peuvent avoir des effets physiologiques (**Figure 15**). Si un grand nombre d'individus sont affectés par ces modifications physiologiques, les effets des toxiques peuvent être décelables au sein des populations et perturber les performances écologiques telles que le taux de croissance, l'expansion, l'efficacité d'utilisation des ressources ou l'adaptabilité (**Figure 16**). A terme, la disparition ou bien l'expansion excessive de populations de certaines espèces peut avoir lieu. Lorsque ces phénomènes touchent des espèces clés²⁸ de l'écosystème, ces effets peuvent se répercuter au niveau des communautés. Ainsi, la structure et le fonctionnement de l'écosystème dans son ensemble peuvent être modifiés (**Figure 14** ; Moore *et al.* 2004b).

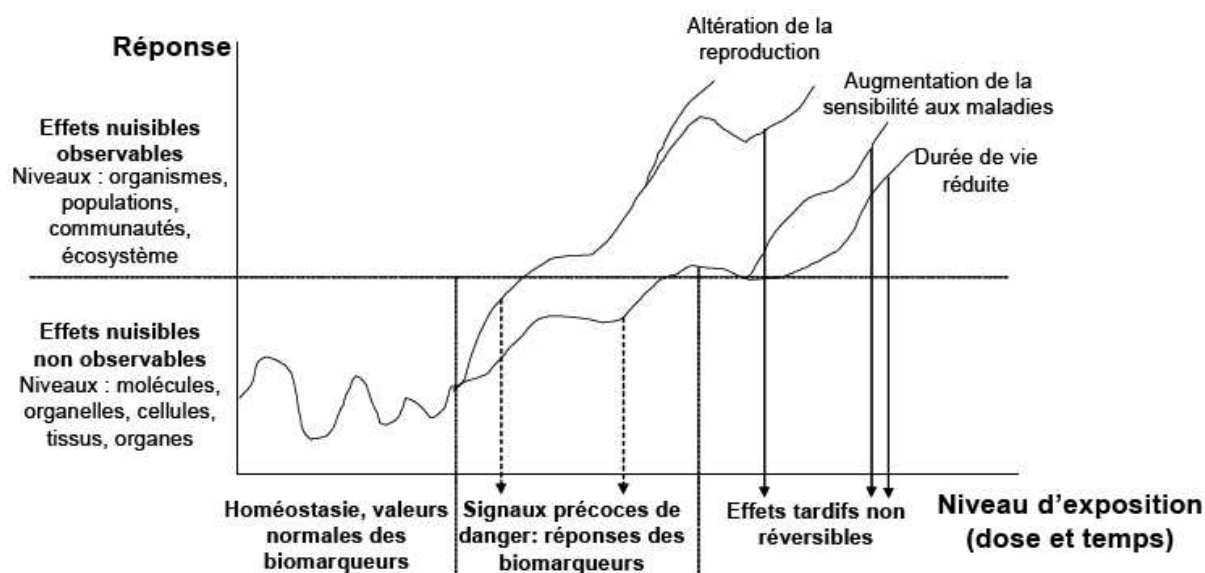


Figure 15 Schéma des réponses des organismes aux effets délétères de l'exposition à des polluants. Modifié d'après Van der Oost *et al.* 2003.

²⁸ Espèce clé : espèce dont la présence est indispensable à l'existence même d'un écosystème, par l'action qu'elle exerce sur les comportements et/ou effectifs des autres espèces qui composent le système, ayant ainsi une influence considérable sur la structure communautaire.

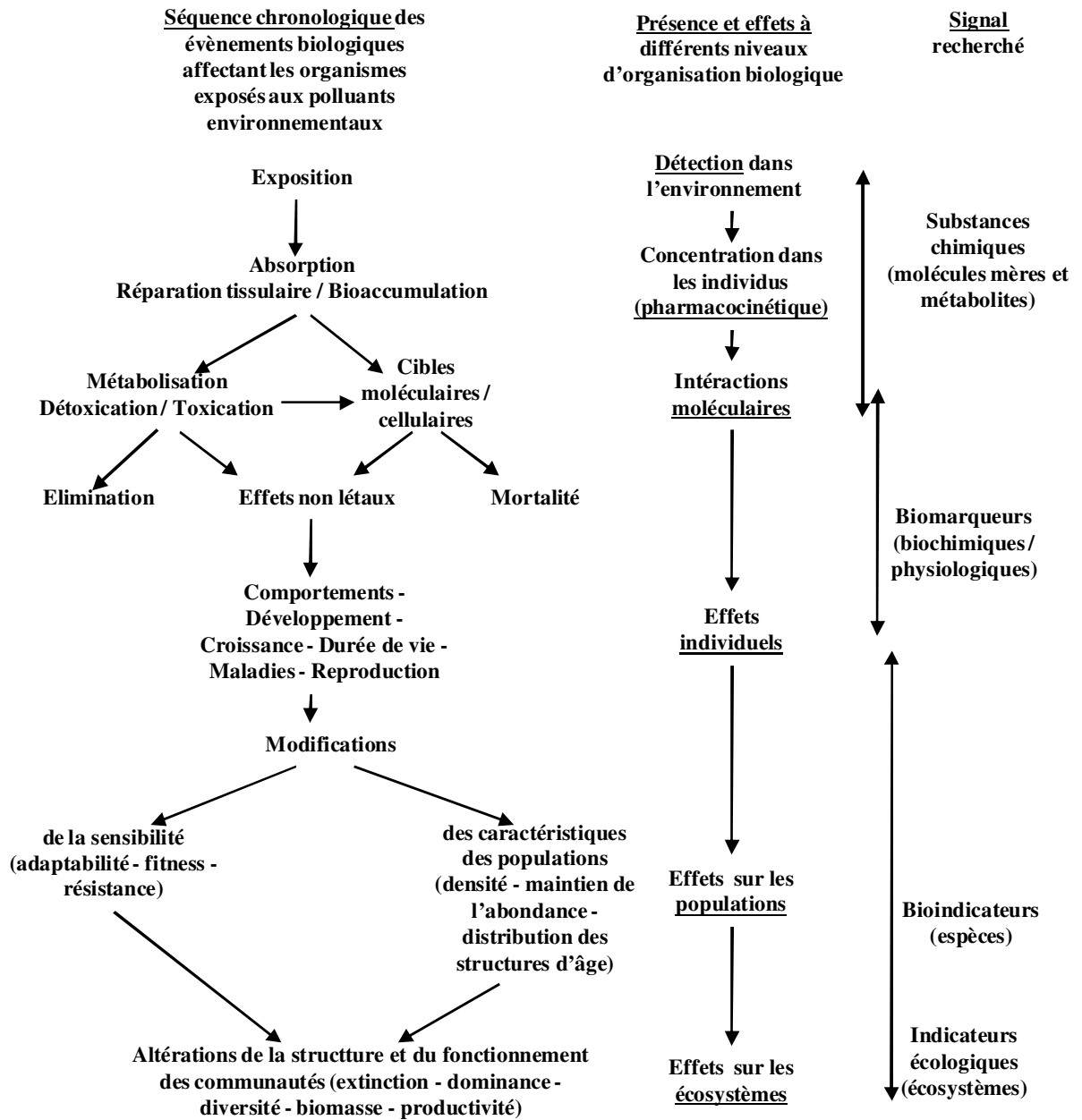


Figure 16 Enchaînement des effets toxiques sur les différents niveaux d'organisation biologique. Selon Gagnaire 2005, schéma modifié d'après Lagadic *et al.* 1997.

Les effets à des niveaux hiérarchiques élevés (population, communauté, écosystème, santé humaine) sont souvent complexes et difficiles à détecter de façon précoce (Lagadic *et al.* 1994, Moore *et al.* 2004b). Néanmoins, comme évoqué précédemment, ces effets sont toujours précédés de changements à des niveaux hiérarchiques inférieurs de l'organisation biologique. Ainsi, des signaux de détresse peuvent être détectés aux niveaux moléculaire et cellulaire, de façon plus précoce, puis un lien peut être effectué entre ces signaux et les conséquences possibles aux niveaux d'organisation supérieurs (Moore *et al.* 2004b). Les cascades des réponses biologiques induites par les contaminants, peuvent alors servir de biomarqueurs.

Des biomarqueurs pertinents de l'exposition et/ou de l'effet d'une contamination sont des indices sensibles de :

- la biodisponibilité d'un polluant
- et des réponses biologiques précoces.

Afin d'évaluer la robustesse d'un biomarqueur, six points doivent être considérés (Bayne *et al.* 1979, Van der Oost *et al.* 2003) :

- Evaluation du biomarqueur sous assurance qualité, coût peu élevé et facile à réaliser ;
- Sensible à l'exposition au contaminant et marqueur précoce d'alerte ;
- Données de base du biomarqueur connues pour faire la différence entre les variations naturelles et celles liées à un risque environnemental ;
- Impacts de plusieurs facteurs sur le biomarqueur;
- Mécanismes sous-jacents des relations entre la réponse du biomarqueur et la dose et le temps d'exposition au contaminant;
- Signification toxicologique du biomarqueur, i.e., les relations entre la réponse du biomarqueur et l'impact à long terme sur l'organisme, doit être établie.

Différentes réponses biologiques ont ainsi été utilisées comme biomarqueurs dans la biosurveillance de milieux marins. Les biomarqueurs étaient classifiés dans le passé en trois types : biomarqueurs d'exposition²⁹, d'effet³⁰ et de susceptibilité³¹ (Manahan 2003). En

²⁹ Biomarqueurs d'exposition: indiquent la pénétration du contaminant dans l'organisme, suite à une interaction de celui-ci avec des molécules biologiques

³⁰ Biomarqueurs d'effet: indiquent l'effet, toxique ou non, exercé par le contaminant sur une cible critique de l'organisme

2000, De Lafontaine *et al.* ont proposé une nouvelle classification permettant de différencier les biomarqueurs 1) de défense et 2) de dommage.

Les biomarqueurs de défense correspondent à des mécanismes permettant à l'organisme de survivre dans un environnement détérioré et ayant donc un impact positif sur leur santé. L'investissement énergétique dans ces mécanismes de défense ou « coût de tolérance » au contaminant peut devenir une contrainte pour l'organisme, du fait qu'il se réaliserait aux dépens d'une énergie qui pourrait être allouée au métabolisme de base, la croissance et/ou la reproduction (fitness) (Holloway *et al.* 1990). Les biomarqueurs de dommage correspondent à des atteintes biologiques pouvant conduire à une incapacité à se reproduire, voire à survivre. Quelques exemples de biomarqueurs étudiés chez les bivalves sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 Classification et exemples de biomarqueurs pouvant être utilisés chez les bivalves marins. GST : glutathion-S-transférase ; MXDM : mécanisme de défense multixénobiotique ; SOD : superoxyde dismutase ; CAT : catalase ; GPx : glutathion peroxydase ; GSSH : glutathion ; HSP : protéines de choc thermique ; AChE : acétylcholinestérase ; nd : non déterminés.

	BIOMARQUEURS DE DEFENSE	BIOMARQUEURS DE DOMMAGE
Core biomarkers*	Enzymes de phase II (GST)	AChE
	Enzymes de phase III (MXDM)	Vitellogénine
	Métallothionéines	Stabilité de la membrane lysosomale
	Défenses antioxydantes enzymatiques (SOD, CAT, GPx) et non enzymatiques (GSSH)	Péroxydation lipidique
	HSP	Dommages à l'ADN, adduits ADN
Autres	nd	Marqueurs moléculaires (cortisol, rétinol)
		Marqueurs subcellulaires et cellulaires (marqueurs immunologiques)
		Marqueurs tissulaires

*Biomarqueurs reconnus dans le cadre de la convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique Nord-Est de la Commission d'Oslo et de Paris (OSPAR)

Décrits avant comme biomarqueurs d'exposition

Décrits avant comme biomarqueurs d'effet

Dans ce contexte général, nous avons cherché à approfondir les connaissances sur les PO chez *C. gigas* et à évaluer leur potentiel à être utilisées comme biomarqueurs de défense et/ou de dommage de stress environnemental. La première étape de ce travail a consisté alors à identifier les différentes activités PO potentiellement présentes chez cette espèce.

³¹ Biomarqueurs de susceptibilité: indiquent la capacité, inhérente ou acquise, de répondre à l'exposition à un contaminant spécifique.

CHAPITRE 1 : Identification des activités phénoloxydase et implication dans les mécanismes de défense immunitaire

Le premier chapitre de cette thèse porte sur les différentes activités PO présentes chez *Crassostrea gigas* et sur leur implication potentielle dans les mécanismes de défense de cette espèce. Ce chapitre est divisé en deux parties. Dans chaque partie sont présentés le contexte scientifique de l'étude, puis la démarche scientifique entreprise et les principaux résultats obtenus. Nous allons présenter, dans la première partie, une optimisation du protocole de dosage des PO 1) qui a permis de mettre en évidence, pour la première fois chez *C. gigas*, la présence d'une activité de type PO (Hellio *et al.* 2007) et 2) d'émettre l'hypothèse que l'activité PO dosée au niveau du plasma de *C. gigas* pourrait être un biomarqueur potentiel de contamination (Bado-Nilles 2008). Nous exposerons ensuite 1) l'approche entreprise pour identifier différentes activités PO dans le plasma de *C. gigas* et dans d'autres tissus et compartiments hémolymphatiques, ainsi que 2) les premiers résultats obtenus sur la caractérisation des PO chez *C. gigas*. Puis, dans la deuxième partie, nous présenterons l'approche *in vitro* que nous avons entreprise, permettant de tester pour la première fois chez *C. gigas* l'implication des activités PO dans les mécanismes de défense immunitaire de cette espèce. Pour ceci, nous avons focalisé notre étude sur deux souches bactériennes, pathogènes de *C. gigas* et fréquemment associées aux mortalités estivales, *Vibrio splendidus* et *V. aesturianus*.

Partie 1 : Optimisation du protocole de dosage, identification et caractérisation partielle des phénoloxydases dans différents tissus



CONTEXTE SCIENTIFIQUE

1. Généralités sur les PO et la mélanisation

1.1. Les principaux rôles de la mélanine chez les être vivants

Les mélanines sont des pigments constitués de biopolymères de polyphénols. Leur couleur varie du jaune au noir. Les mélanines sont présentes à travers toute l'échelle phylogénétique et jouent des rôles variés (**Tableau 4** ; Riley 1997).




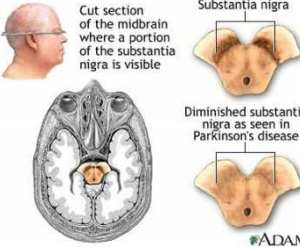
Chez les invertébrés, la mélanisation joue un rôle important dans la reconnaissance du non-soi, la production de substances toxiques contre les agents pathogènes, la réparation des blessures, le durcissement de la cuticule et l'apparition de facteurs stimulant les défenses cellulaires, telles que la phagocytose ou l'encapsulation (Cerenius *et al.* 2008). Chez certains invertébrés comme les bivalves, les mélanines jouent également un rôle dans la formation et la pigmentation de la coquille (Gordon & Carriker 1980) et favorisent le comportement de fixation chez les larves d'huître dans le milieu naturel (Coon *et al.* 1985).

1.2. Les phénoloxydases, enzymes-clé de la mélanisation

La mélanisation (production de mélanine ou mélanogénèse) commence par la transformation de tyrosine en DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine), puis en dopaquinone. Les deux réactions sont catalysées par des phénoloxydases (PO, code EC 1.14.18.1 établi par la Commission Internationale d'Enzymes). Une série de processus enzymatiques et non enzymatiques mène ensuite à la formation de différentes formes de mélanine (**Figure 17**) :

- En présence de cystéine, la formation de cystéinyl-DOPA mène à la production de phéomélanines (couleur jaune) ;

Tableau 4 Principaux rôles de la mélanine chez les êtres vivants.

Rôles	Actions	Exemples	Exemple illustré
Structuraux	Rigidification des structures, en participant aux liaisons entre les protéines	Augmentation de la rigidité des gousses des graines chez les plantes et de la cuticule chez les insectes	
Antibiotiques	Implication dans la production d'orthoquinones (durant la voie de biosynthèse de la mélanine) hautement réactives, ayant des groupements nucléophiles tels que les groupements thiols (-SH) et les groupements amines (-NH ₂)	Propriétés antibiotiques dans le système immunitaire des invertébrés (résistance à des agents pathogènes, durcissement de la cuticule, cicatrisation de blessures), encre des céphalopodes et substances sécrétées par les insectes comme moyen de défense	
Protection contre les photons	Génération de la couleur des téguments (cheveux, peau et yeux), pour refléter la lumière ou pour agir comme un pigment photoprotecteur, voire génoprotecteur, dans des cellules exposées à de hautes doses de radiation	Thermorégulation chez les reptiles (dissipation de chaleur), camouflage de différents organismes tels que les céphalopodes et les caméléons, rôle dans le dimorphisme sexuel ou comme signal d'un changement de température, de l'exposition à un stress ou de changements visibles dans le milieu environnant, ou protection de la peau contre les rayons ultra-violets	
Chémoprotection	Protection contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les cations potentiellement toxiques tels que les métaux de transition dans différentes cellules comme les neurones, par exemple	La maladie de Parkinson où a lieu une dégénérescence des cellules contenant de la mélanine dans la <i>substantia nigra</i>	

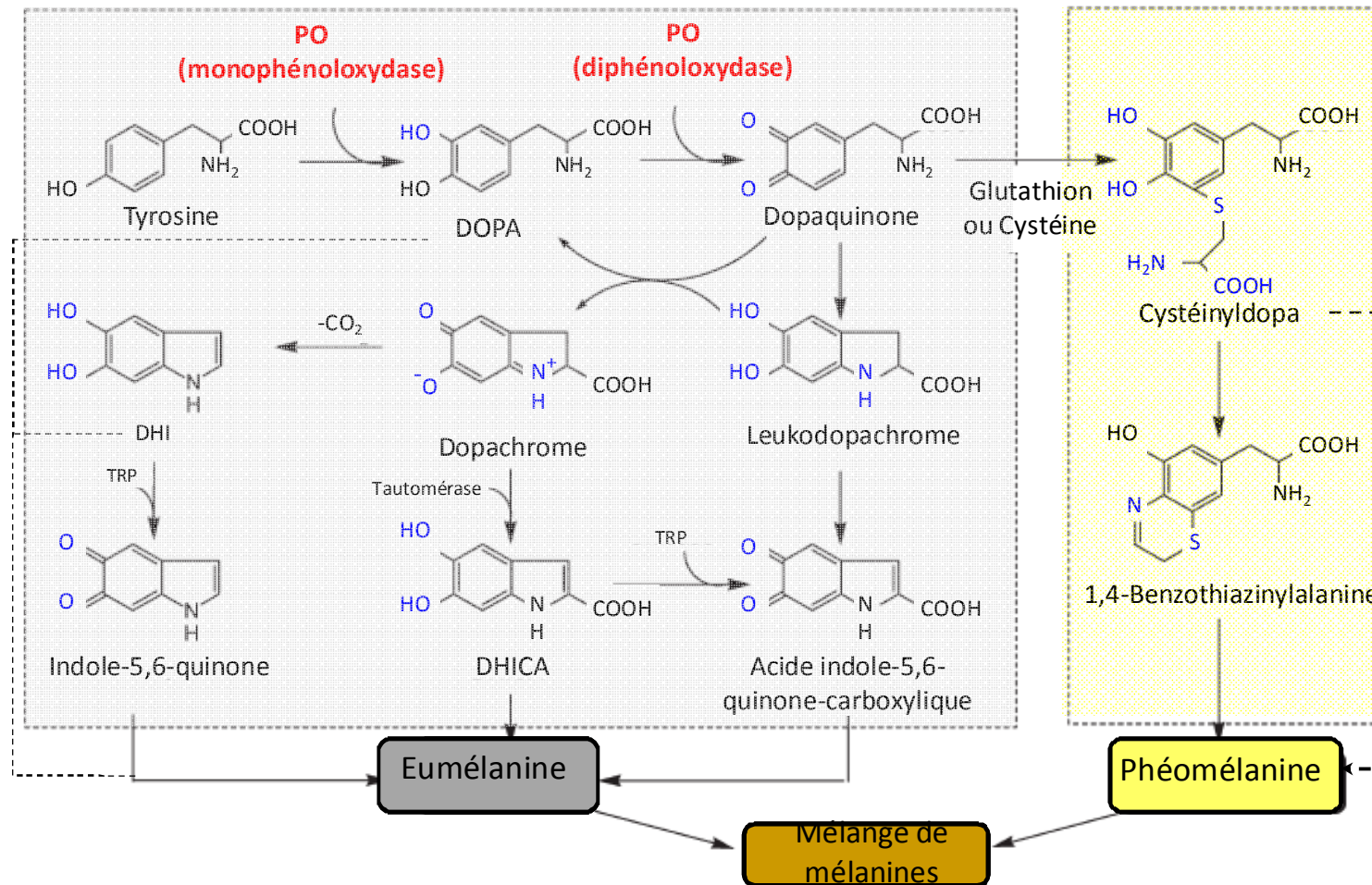


Figure 17 La mélanisation chez les êtres vivants. Modifié de Kim & Uyama 2005. La synthèse de la mélanine commence par l'hydroxylation de la tyrosine et/ou l'oxydation de la DOPA, réactions catalysées par les PO. Suite à une cascade de réactions enzymatiques et non enzymatiques, les eumélanines, les phéomélanines et des mélanges de mélanines sont formés. Les lignes en pointillés indiquent des molécules qui peuvent faire partie du polymère de mélanine. DOPA: 3,4-dihydroxyphénylalanine; DHI: 5,6-dihydroxyindole; DHICA: acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique; TRP: protéine en relation avec la tyrosinase (en anglais, tyrosinase-related protein).

- En absence de cystéine, la formation de l'indole-5-6 quinone, ou la formation de l'acide 5,6-dihydroxyindole-carboxylique et/ou de l'acide indole-5,6-quinone-carboxylique mène à la production d'eumélanine (couleur noire).

Un mélange de phéomélanines et d'eumélanines mène à la production d'un mélange de mélanines de couleur brune.

2. Aspects biochimiques des phénoloxydases

Les premiers travaux sur les PO ont été réalisés chez les champignons il y a plus d'un siècle (Bertrand 1896). Cependant, les expériences d'isolement des protéines ont commencé seulement 42 ans plus tard, révélant différentes propriétés fonctionnelles et structurales des PO (Keilin & Mann 1938, Kubowitz 1938).

2.1. Classification des phénoloxydases

Environ un tiers des protéines sont des métalloprotéines, c'est-à-dire des protéines capables de lier un ou plusieurs ion(s) métallique(s) et ont quatre principales fonctions : 1) stockage et transport d'ions métalliques ; 2) transfert d'électrons ; 3) stockage et transport d'oxygène et 4) catalyse. Les PO appartiennent au groupe des métalloprotéines, et plus particulièrement des métalloprotéines à cuivre. Ce sont des oxydoréductases qui catalysent l'oxydation de composés phénoliques en présence d'oxygène (O₂).

Une des principales difficultés face au groupe enzymatique rassemblant les PO concerne les nombreuses ambiguïtés et approximations rencontrées dans la littérature : les termes « tyrosinases », « phénoloxydases » et « catécholases » sont utilisés dans de nombreux cas comme des synonymes (Solomon *et al.* 1996, Claus & Decker 2006). De plus, les tyrosinases et les PO possèdent le même numéro EC, même si elles ne possèdent pas forcément les mêmes caractéristiques.

Ainsi, la première étape de cette thèse a consisté à réaliser une recherche bibliographique approfondie sur le sujet. Ceci a permis de clarifier le fait que le terme PO faisait référence

à un large groupe d'enzymes. Puis, en fonction de la spécificité de substrat (**Figure 18**), le groupe des PO comprend trois types d'enzymes (Walker & Ferrar 1998):

1) Les **tyrosinases** EC 1.14.18.1 (monophénol, o-diphénol, O₂ oxydoréductase), qui peuvent catalyser 1) l'ortho-hydroxylation des monophénols (activité crésolase ou monophénoloxydase) et 2) l'oxydation d'o-diphénols, menant à la formation d'o-quinones et à la réduction d'oxygène en eau (activité catécholase ou diphénoloxydase) ;

2) Les **catécholases** EC 1.10.3.1 (o-diphénol, O₂ oxydoréductase) qui possèdent uniquement une activité catécholase (ou diphénoloxydase) ;

3) Les **laccases** EC 1.10.3.2 (p-diphénol, O₂ oxydoréductase, benzenediol: O₂ oxydoréductase), qui possèdent une activité catécholase (ou diphénoloxydase) mais qui peuvent catalyser également l'oxydation de m- et p-diphénols et d'autres composés, tels que les amines aromatiques.

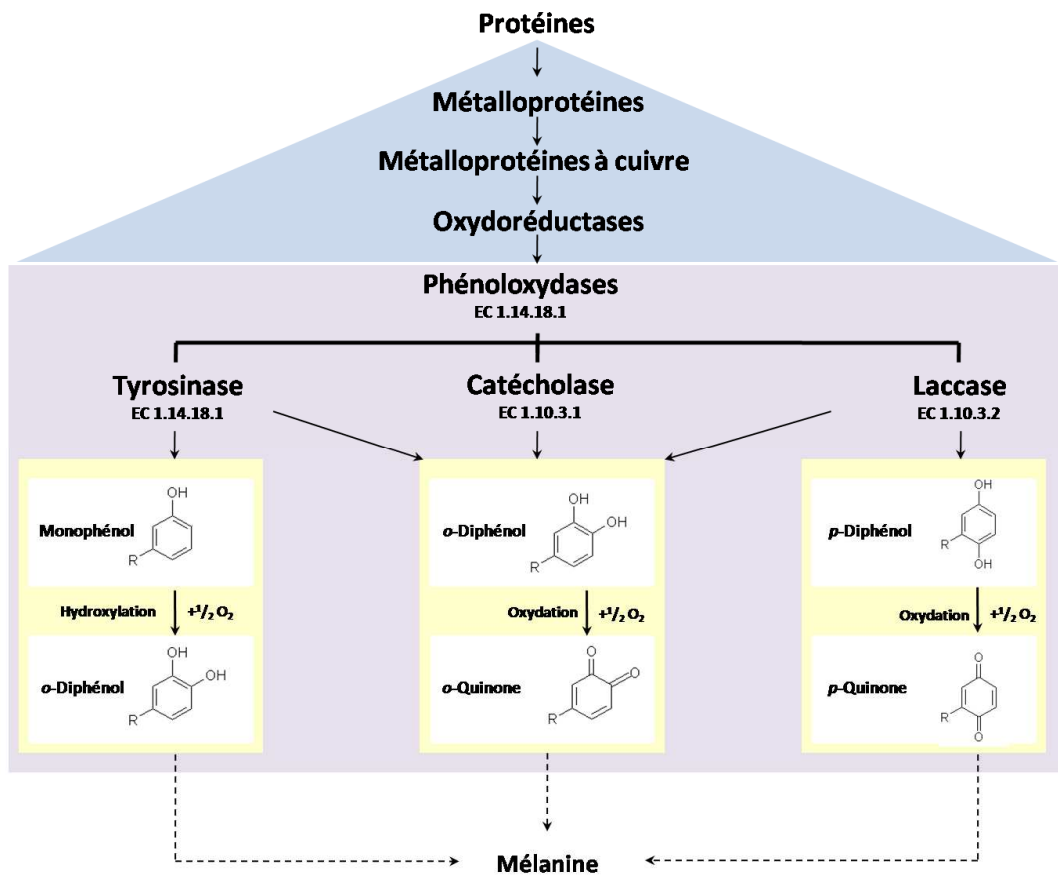


Figure 18 La classification des phénoloxydases. Modifié selon Walker & Ferrar 1998. Les phénoloxydases sont un groupe de métalloprotéines à cuivre, comprenant les tyrosinases, les catécholases et les laccases. Toutes les phénoloxydases possèdent une affinité pour les o-diphénols mais seules les tyrosinases possèdent une affinité pour les monophénols et seules les laccases possèdent une affinité pour d'autres substrats tels que les m- et p-diphénols ou les amines aromatiques.

Nous insistons alors sur la distinction nécessaire à faire entre la classe de l'enzyme et sa spécificité d'action : les tyrosinases possèdent une activité crésolase et une activité catécholase, les catécholases une activité catécholase, et les laccases une activité catécholase et une activité laccase (**Tableau 5**).

Tableau 5 Spécificité d'action des phénoloxydases. Selon Walker & Ferrar 1998.

Activité \ Enzyme	Crésolase ¹	Catécholase ²	Laccase
Tyrosinase	✓	✓	✗
Catécholase	✗	✓	✗
Laccase	✗	✓	✓

✓ Présence

✗ Absence

¹ Ou monophénoloxydase

² Ou diphénoloxydase

2.2. Structure des phénoloxydases

La structure primaire de nombreuses PO végétales a pu être déduite par des approches de biologie moléculaire et l'étude de leurs transcrits (Marques *et al.* 1995, Van Gelder *et al.* 1997; **Figure 19**). Ces études ont permis d'en déduire une organisation structurale typique comprenant :

- 1) Un peptide signal dans la région N-terminale, responsable du transfert de la PO immature dans les thylacoïdes (Murata *et al.* 1997) ;
- 2) Une séquence de clivage qui peut être reconnue par des protéases ;
- 3) Un domaine central contenant deux sites de liaison au cuivre, correspondant à la PO mature ;
- 4) Un second site de clivage, sensible à la protéolyse ;
- 5) Un domaine C-terminal, présent uniquement dans les formes latentes des PO des haricots, des raisins, des champignons et des pommes (Marques *et al.* 1995, Van Gelder *et al.* 1997).

Chez l'Homme et la souris, les tyrosinases sont des protéines transmembranaires, contenant un peptide signal et un domaine transmembranaire (Riley 1997, Decker *et al.* 2007) alors que chez les arthropodes et les insectes, il ne semble pas y avoir présence de peptide signal (Söderhäll & Cerenius 1998). En fait, seuls les sites de liaison du cuivre

semblent être conservés entre les gènes des mammifères, des invertébrés, des champignons et des bactéries (Decker & Terwillinger 2000).

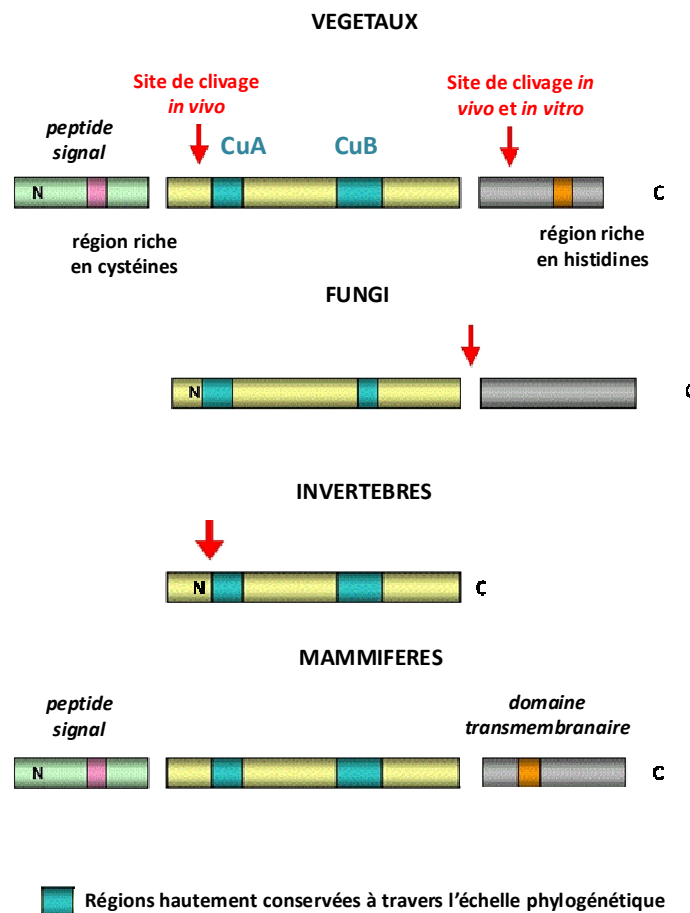


Figure 19 Structure primaire des phénoloxydases. Modifié d'après Van Gelder *et al.* 1997. Chez les plantes, les champignons, les invertébrés et les mammifères, la structure primaire des phénoloxydases a été déduite par des séquences d'ADNc. Les séquences peptidiques codant pour les sites de liaison au cuivre CuA et CuB au niveau du site actif sont fortement conservées à travers l'échelle phylogénétique.

Généralement, le site actif possède la même structure, un centre possédant deux régions de liaison au cuivre appelées CuA et CuB. Dans ces régions, chaque atome de cuivre est coordonné par trois résidus d'histidine (**Figure 20**).

A notre connaissance, la séquence de gènes codant pour des PO de seulement deux espèces de bivalves est disponible en banque (référence GenBank) : un gène codant pour une tyrosinase chez l'huître *Pinctada fucata* et un gène codant pour une laccase chez *C. gigas* (n° d'accès GenBank NCBI ID: DQ112679 et EU678320, respectivement).

On retrouve dans les séquences de ces gènes des régions codant pour des sites cuivre. Un gène codant pour une laccase chez *C. gigas* a pu être mis en évidence suite à la réalisation d'une hybridation suppressive soustractive³² (SSH). Cette SSH visait à caractériser les gènes sur- et sous-exprimés suite à l'infection par l'herpès virus OsHV-1 (Faury & Renault, pers. comm.). L'infection par OsHV-1 provoque une surexpression du gène codant pour une laccase dans les hémocytes de *C. gigas*. Ce gène semblerait être alors impliqué dans les mécanismes de défense de cette espèce. Il est possible que d'autres gènes chez *C. gigas* codent pour d'autres PO, mais, du fait de la méthode employée (SSH), ces gènes n'ont pas pu être identifiés.

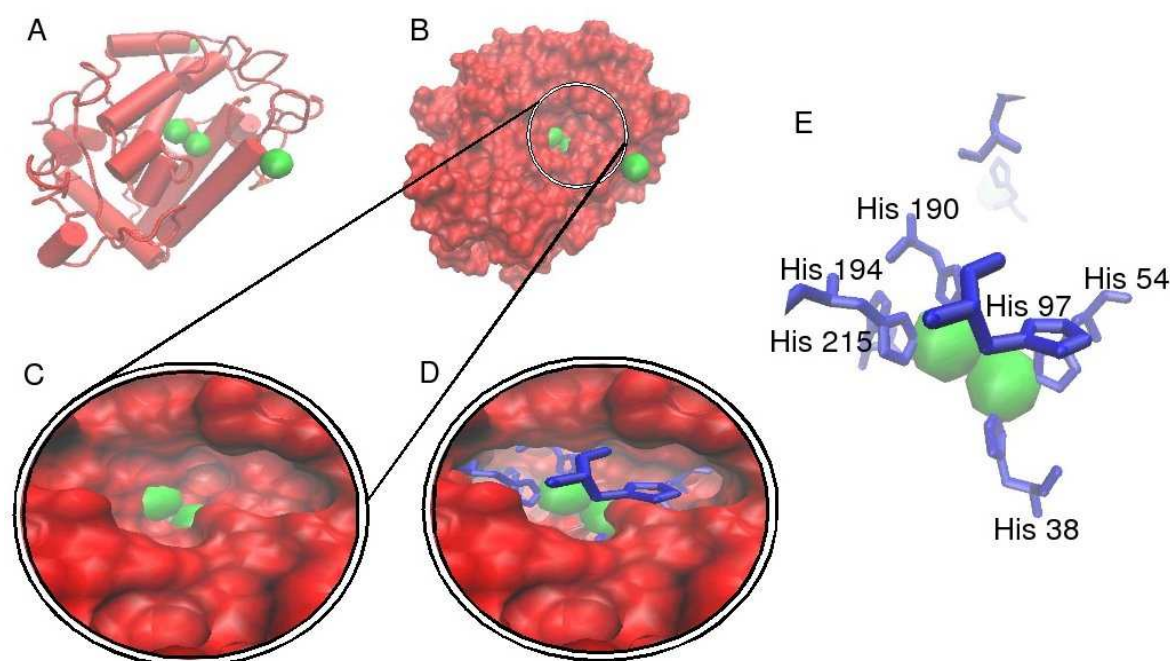


Figure 20 Structure cristallographique d'une phénoloxydase. D'après Matoba *et al.* 2006. Une tyrosinase de *Streptomyces sp.* a été cristallisée, associée à une protéine dite "caddie" qui semble intervenir dans le transport du cuivre vers le fond du site actif de l'enzyme. Seule la molécule de tyrosinase apparaît sur la figure ; en vert : atomes de cuivre ; en rouge : la surface moléculaire ; en bleu : les acides aminés d'histidine. Le site actif de la protéine est localisé au niveau d'un pilus, formé à la surface de la molécule (C et D). Chaque atome de cuivre au niveau du site actif est complexé par trois résidus d'histidine (E).

³² SSH: La SSH est une approche qui se base sur la préparation de banques soustractives, ce qui permet d'obtenir un nombre important de séquences de transcrits préférentiellement exprimés dans une condition donnée. Des étapes d'hybridations soustractives permettent d'éliminer les transcrits communs aux échantillons analysés. Les fragments soustractifs sont amplifiés par deux étapes de PCR afin de normaliser l'abondance des séquences isolées. Les fragments de transcrits ainsi obtenus sont clonés et un programme de séquençage est appliqué afin d'identifier ces séquences.

3. Le système prophénoloxydase chez les invertébrés

3.1. Le mécanisme d'activation

Chez les invertébrés, l'infection par un agent pathogène peut conduire à une réponse immunitaire à médiation humorale. Cette réponse inclut l'activation de protéines présentes de façon constitutive dans l'hémolymphe telles que les prophénoloxydases, qui existent sous la forme d'un zymogène inactif appelé proPO (Cerenius *et al.* 2008). Le mécanisme d'activation du système proPO chez les invertébrés a été comparé dans le passé à d'autres mécanismes d'activation de cascades impliquées dans les mécanismes de défense telles que la cascade Toll, présente chez de nombreux invertébrés, ou la cascade de coagulation du sang et le système du complément chez les mammifères (Alan *et al.* 1998).

Une cascade d'activation par des sérines protéases mène à la conversion du zymogène proPO en PO. Cette cascade serait activée suite à la reconnaissance de PAMP, tels que les peptidoglycanes ou les LPS des bactéries et les β -1,3-glucanes des champignons, par des PRP de l'hôte (**Figure 21**). Une fois activée, la PO est à l'origine d'une série d'étapes qui va conduire à la mélanisation (**Figure 21**; Söderhäll & Cerenius 1998). A notre connaissance, aucune étude chez les bivalves ne s'est intéressée à expliquer les mécanismes d'activation du système proPO chez ces organismes *in vivo*. Mais, récemment, un mécanisme d'activation des proPO a été proposé par Cerenius *et al.* (2008) chez les crustacés, et plus particulièrement chez l'écrevisse (**Figure 21**).

Une fois la PO est activée, l'initiation des réactions d'oxydation des phénols par les PO déclenche la mise en œuvre de mécanismes de défense physiques et chimiques. Certains composés intermédiaires de cette cascade de mélanisation (i.e., des quinones) sont des molécules toxiques qui, lorsqu'elles sont produites en grandes quantités, peuvent générer un dommage aux tissus et aux cellules de l'hôte. De ce fait, il est important que le système proPO soit contrôlé et régulé.

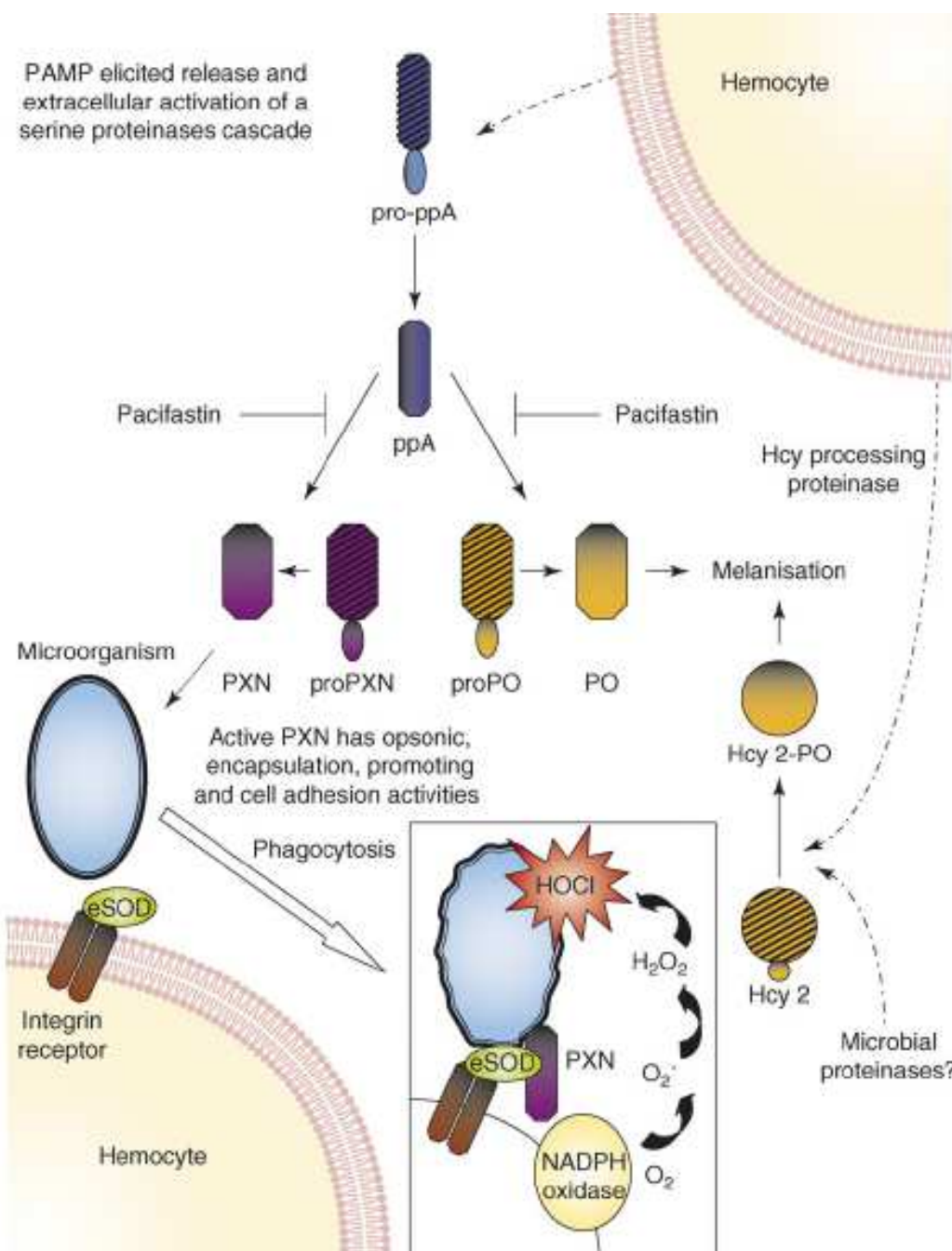


Figure 21 Activation du système prophénoloxdase (proPO) et de l'immunité cellulaire chez les crustacés. Selon Cerenius *et al.* 2008. Chez l'écrevisse, toutes les enzymes du système prophénoloxdase (proPO) sont stockées sous une forme inactive dans les granulocytes des hémocytes. Une reconnaissance de motifs moléculaires associés à des pathogènes (PAMP) entraîne une libération de protéines du système d'activation de la proPO (proPO-AS) par exocytose. A l'extérieur des hémocytes, une cascade de protéases (non montrée) déclenche l'activation de l'enzyme activatrice de la proPO (pro-ppA) en enzyme active (ppA), conduisant au clivage protéolytique de la proPO en PO. Des intermédiaires sécrétés lors de cette cascade d'activation tels que la peroxynectine (PXN) sont impliqués dans des processus d'opsonisation du pathogène, facilitant son internalisation lors de la phagocytose. La destruction des pathogènes est ensuite assurée par la génération d'intermédiaires d'oxygène réactives (HOCl) via le complexe NADPH oxydase. Indépendamment de la cascade du système proPO, une hémocyanine (Hcy 2) pourrait être à l'origine d'une protéine exprimant l'activité PO (Hcy 2-PO).

3.2. Le contrôle du mécanisme d'activation

Chez les invertébrés, le premier niveau de contrôle du système proPO est le système proPO lui-même qui nécessite un clivage enzymatique pour libérer des enzymes actives (**cf. Figure 12, Etat de l'art**). Le second contrôle correspond à des inhibiteurs de protéase qui vont empêcher une activation prématurée ou excessive de l'activation du système proPO (**cf. Figure 12, Etat de l'art**). Par conséquent, la stimulation du système d'activation de la proPO (proPO-AS) est régulée par une cascade de protéases à sérines hautement spécifiques et agit comme une réaction transitoire locale contre l'organisme envahisseur (Cerenius *et al.* 2008).

Des inhibiteurs de protéase présents dans le plasma, à l'instar des macroglobulines (Gollas-Galván *et al.* 2003) ou des serpinines (Liang & Söderhäll 1995), réduisent l'activité 1) de l'enzyme activatrice de la proPO (ppA), ou 2) des protéases à sérines d'une façon non spécifique (**cf. Figure 12, Etat de l'art ; Liang & Söderhäll 1995**).

Chez *C. gigas*, une séquence de serpine est répertoriée dans la banque d'EST, mais sa fonction n'a pas encore été définie (Gueguen *et al.* 2003).

4. Principales méthodes utilisées pour étudier l'effet des contaminants sur les phénoloxydases des bivalves

De façon optimale, la réponse des biomarqueurs doit être facile à mesurer, peu coûteuse, sensible et spécifique. Une des contraintes lorsqu'on travaille avec les PO, ainsi qu'avec d'autres enzymes utilisées comme biomarqueurs (dans l'évaluation de l'effet des contaminants sur les organismes marins) est le fait que presque chaque étude a été réalisée avec une technique propre ce qui rend difficile la comparaison des résultats entre différentes études (**Tableau 6**).

4.1. Approches cellulaires

Une des premières techniques développées pour étudier l'impact des contaminants chimiques sur l'activité PO chez les bivalves a été la coloration des cellules (Coles & Pipe 1994 ; **Tableau 6**). Cependant, cette technique ne permet pas d'avoir une information quantitative précise de l'activité de l'enzyme.

4.2. Approches moléculaires

Plus récemment, la technique de PCR quantitative (PCRq) a été employée pour étudier l'effet des contaminants sur l'expression des gènes (**Tableau 6**). Cependant, outre le fait que les approches moléculaires soient plus coûteuses que les approches cellulaires, des études à l'échelle du gène ne donnent une information que sur les régulations ayant lieu au niveau transcriptionnel, omettant les régulations pouvant avoir lieu aux niveaux post-transcriptionnel et/ou post-traductionnel.

4.3. Approches biochimiques

Actuellement, la plupart des études permettant d'étudier l'effet des contaminants sur les activités PO chez les bivalves sont réalisées en mesurant par spectrophotométrie l'apparition du produit ou la disparition du substrat de la réaction catalysée par l'enzyme. Ces études permettent de réaliser deux types d'analyses : une analyse en point final ou une analyse cinétique (**Tableau 6**).

Par rapport à d'autres techniques, les dosages des activités en spectrophotométrie sont relativement faciles à réaliser, peu coûteux et permettent d'avoir des informations quantitatives sur l'activité des enzymes. De ce fait, dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi d'employer principalement des techniques biochimiques classiques de mesure d'activité enzymatique.

Tableau 6 Principales méthodes utilisées pour étudier l'effet des contaminants sur les phénoloxydases des bivalves. Hc : hémocytes ; P : plasma ; B : branchies ; GD : glande digestive ; M : manteau ; Cu : cuivre ; Hg : mercure ; Cd : cadmium ; Pb : plomb ; TBT : tributylétain ; CuSO₄ : sulfate de cuivre ; NI : non indiqué.

Méthode utilisée	Organisme	Tissu	Approche	Contaminant	Concentration	Temps (jours)	Références
Effet des métaux :							
Coloration des cellules : Lames incubées avec L-DOPA	Moule bleue <i>Mytilus edulis</i>	Hc	<i>In vivo</i>	Cu	0,02 / 0,05 mg l ⁻¹	7	Pipe <i>et al.</i> 1999
Spectrophotométrie: L-DOPA, 490 nm, 21 h (point final, tampon CAC)	Huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	P		Hg	2.10 ⁻⁶ / 2.10 ⁻⁵ M	1	Gagnaire <i>et al.</i> 2004
		P		Cd	500 ng l ⁻¹	66	Babior 1984
Spectrophotométrie: L-DOPA, 5 min (cinétique)	Moule verte <i>Perna viridis</i>	P		Cu	20 µg l ⁻¹	25	Thiagarajan <i>et al.</i> 2006
				Hg	10 µg l ⁻¹		
Spectrophotométrie : L-DOPA (méthode de Pang <i>et al.</i> 2005)	Huître perlière <i>Pinctada fucata</i>	B		Cu	0,05 µM	3	Jing <i>et al.</i> 2006
		GD					
		B		Cu	0,5 µM		
		GD					
		M		Pb	0,5 µM		
Effet des hydrocarbures :							
Coloration des cellules : Lames incubées avec L-DOPA	Moule bleue <i>Mytilus edulis</i>	Hc	<i>In vivo</i>	Fluoranthène	200 / 400 µg l ⁻¹	7	Coles & Pipe 1994
Spectrophotométrie : L-DOPA, 21h, 490 nm (point final, tampon CAC)	Huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	P	<i>In vitro</i>	Benzo(b)fluoranthène	10 ⁻⁷ / 10 ⁻⁹ mg l ⁻¹	1	Bado-Nilles 2008
			<i>In vivo</i>	Fuel lourd	733 ± 111 ng l ⁻¹	9	Bado-Nilles 2008
		Hc		Fuel léger	600 ± 315 ng l ⁻¹	7	Bado-Nilles 2008, Bado-Nilles <i>et al.</i> 2010
PCRq : Expression relative de l'ARNm							
Effet des biocides :							
Purification et spectrophotométrie avec L-DOPA, 475 nm, 1 min (cinétique)	Moule bleue <i>Mytilus edulis</i>	Pied	<i>In vitro</i>	TBT	10 mg l ⁻¹	NI	Hellio <i>et al.</i> 2000
		Pied	<i>In vitro</i>	CuSO ₄	10 mg l ⁻¹	NI	

5. Les substrats des phénoloxydases

La majorité des études portant sur les PO chez les bivalves tels que *C. gigas* sont conduites avec des substrats communs aux différentes PO, c'est-à-dire des o-diphénols tels que la L-DOPA ou la dopamine (e.g., Asokan *et al.* 1997, Hellio *et al.* 2000, Lacoste *et al.* 2001b, Luna-González *et al.* 2003, Gagnaire *et al.* 2004, Bouilly *et al.* 2006, Jing *et al.* 2006, Thiagarajan *et al.* 2006, Bado-Nilles *et al.* 2009, Thomas-Guyon *et al.* 2009).

Cependant, contrairement au cas des vertébrés qui possèdent uniquement des tyrosinases (Riley 1997), les trois types de PO ont été détectés chez divers invertébrés avec comme exemples une tyrosinase chez la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* (Asada *et al.* 1993), une catécholase chez le crabe *Charybdis japonica* (Liu *et al.* 2006), une catécholase et une laccase chez l'écrevisse *Procambarus clarkii* (Cardenas & Dankert 2000). Du fait de leur faible spécificité, les substrats communs aux trois types de PO (tyrosinases, catécholases et laccases) ne sont pas appropriés pour discriminer les trois types d'activité PO (crésolase, catécholase et laccase).

Ces derniers peuvent être toutefois identifiés en utilisant des substrats plus spécifiques tels que :

- les monophénols (pour détecter des activités crésolase) ;
- les p-diphénols, les m-diphénols ou des substrats non phénoliques tels que les diamines (pour détecter des activités laccase).

Ainsi, des activités crésolase et catécholase ont été détectées chez des bivalves tels que la palourde *T. philippinarum* (Cong *et al.* 2005) et l'huître *C. virginica* (Jordan & Deaton 2005), respectivement. Les laccases ont été principalement décrites chez les champignons (Perry *et al.* 1993) et les bactéries (Claus 2003) mais la présence de laccase a été évoquée récemment chez les mollusques bivalves (Jordan & Deaton 2005, Aladaileh *et al.* 2007a).

6. Les substrats des phénoloxydases et leur interférence avec d'autres protéines

Plusieurs difficultés surgissent quand l'identification de l'activité PO est réalisée sur un homogénat de tissu non purifié ou partiellement purifié puisque les substrats des PO peuvent être utilisés par 1) les céruloplasmines (ou ferroxidases), 2) les hémocyanines, 3) les cytochrome oxydases et/ou 4) les peroxydases (**Tableau 7**) :

- Les **céruloplasmines** ou ferroxidases (EC 1.16.3.1) sont des protéines transporteuses de cuivre. Elles possèdent une activité oxydase cuivre-dépendante mais ont seulement été détectées, à notre connaissance, chez les vertébrés (Schosinsky *et al.* 1974).

- Les **hémocyanines** sont des protéines transporteuses d'O₂. Ainsi, malgré le fait que les PO et les hémocyanines possèdent un site actif commun, elles jouent des rôles différents (Decker *et al.* 2007). En plus des PO (ou parfois à leur place), les arthropodes et certains mollusques possèdent des hémocyanines. Ces dernières possèdent une capacité de protéine respiratoire mais peuvent également montrer des activités PO sous certaines conditions (Decker *et al.* 2007). Toutefois, la plupart des mollusques lamelibranches, tels que les huîtres, ne possèdent pas de pigments respiratoires (Eble *et al.* 1996).

- Les **cytochrome oxydases** (EC 1.9.3.1) sont des complexes formés de protéines transmembranaires. Elles correspondent à la dernière enzyme dans la chaîne respiratoire de transport d'électrons dans les mitochondries (ou les bactéries) et sont présentes chez différents mollusques tels que les bivalves lamelibranches (Kawai 1959). Du fait que les cytochrome oxydases restent associées aux fragments de membrane, la présence des cytochrome oxydases peut être éliminée en travaillant avec des préparations solubles (Smith & Stotz 1954).

- Les **peroxydases** (EC 1.11.1.7) sont des enzymes hémoprotéiques qui catalysent l'oxydation de nombreux substrats tels que l'acide ascorbique, le ferrocyanide, le cytochrome c et les phénols (Eastmond *et al.* 1986). De ce fait, les peroxydases peuvent aussi catalyser l'oxydation des substrats dédiés à la mesure des activités enzymatiques PO. Cependant, contrairement aux réactions d'oxydation catalysées par les PO qui requièrent la présence d'O₂, les réactions catalysées par les peroxydases requièrent la présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ainsi, la consommation d'oxygène pendant la

réaction enzymatique peut être suivie par oxymétrie. Cette approche permet de confirmer si lorsque l'on dose l'activité PO, on a bien une consommation d'oxygène au cours de cette réaction. De plus, des études en spectrophotométrie, utilisant la catalase qui catalyse la transformation de H₂O₂ en O₂ et H₂O, permettent de confirmer si l'activité mesurée est d'origine peroxydasique. Des inhibiteurs spécifiques des PO peuvent également être utilisés.

Du fait que *C. gigas* est un organisme invertébré et un bivalve lamellibranche, les substrats des PO peuvent être utilisés uniquement par 1) les PO, 2) les cytochrome oxydases et 3) les peroxydases.

Tableau 7 Protéines capables d'utiliser les substrats de phénoloxydases.

Nom	Description	Référence
Phénoloxydases	Protéines cuivre-dépendantes qui, en présence d'oxygène, catalysent l'oxydation de composés phénoliques	Jordan & Deaton 2005
Céruloplasmines	La protéine majoritaire dans le sang des vertébrés, transporteuse de cuivre	Schosinsky <i>et al.</i> 1974
Hémocyanines	Protéines transporteuses d'oxygène	Decker <i>et al.</i> 2007
Cytochrome oxydases	La dernière enzyme dans la chaîne respiratoire de transport d'électrons au niveau de la membrane mitochondriale	Kawai 1959
Péroxydases	Catalyse l'oxydation d'un grand nombre de substrats incluant les composés phénoliques, en présence de peroxyde d'hydrogène	Eastmond <i>et al.</i> 1986

7. Les inhibiteurs des phénoloxydases

Outre l'identification des activités PO *via* l'utilisation de différents substrats, les PO peuvent aussi être différenciées par la spécificité de certains inhibiteurs pour ces enzymes. Les différences d'action de certains inhibiteurs sur les tyrosinases, les catécholases et les laccases seraient probablement dues à des différences dans les réactions mécaniques et les niveaux d'oxydation du cuivre au niveau des sites actifs de ces trois types d'enzymes.

Néanmoins, une attention particulière doit être portée au choix des inhibiteurs. En effet, plusieurs composés décrits dans la littérature comme étant des inhibiteurs spécifiques des PO peuvent avoir un effet inhibiteur non spécifique, c'est-à-dire ne pas agir directement sur l'enzyme (**Tableau 8**).

Tableau 8 Mode d'action des inhibiteurs des phénoloxydases. SO₃²⁻: sulfite, BHA: hydroxyanisole butylé, TBHQ: tertiarybutyl hydroxyquinone, PG: propyl gallate; 2-ME: 2-mercaptoéthanol; NaN₃: azoture de sodium; CO: monoxyde de carbone ; DETC: diéthylthiocarbamate; EDTA: acide éthylènediamine tétra-acétique; MT: métallothionéine; H₂O₂: peroxyde d'hydrogène; DTT: dithiothréitol; 4-HR: 4-hexylrésorcinol; NH₂OH: hydroxylamine; NaBr: bromure de sodium ; NaCl : chlorure de sodium ; CaCl₂ : chlorure de calcium.

Type d'inhibition	Catégorie des composés et mode d'action	Exemples	Références
Inhibiteurs agissant sur l'enzyme	<ul style="list-style-type: none"> • Agents réducteurs: <ul style="list-style-type: none"> ↯ Les sulfites peuvent se lier à des groupements sulfhydryles du site actif de l'enzyme mais peuvent aussi interagir avec les quinones en formant des sulfoquinones. ↯ Les antioxydants inhibent les processus oxydatifs en réagissant avec les radicaux libres, <i>via</i> une chélation métallique et une fixation de l'oxygène. • Chélateurs: <ul style="list-style-type: none"> ↯ Les chélateurs de métaux possèdent deux électrons qui interagissent avec les ions cuivre ou fer. ↯ Les composés avec une structure similaire aux phénols sont plus efficaces que les chélateurs de métaux. Dans les deux cas, cette inhibition a lieu que lorsque le milieu réactionnel est acide. ↯ Les polysaccharides peuvent aussi interagir avec les ions cuivre. • Agents acidifiants : Un pH à 3 ou 4 peut inhiber l'enzyme et même augmenter l'efficacité de nombreux inhibiteurs tels que le NaCl ou le CaCl₂ qui inhibent les PO mais seulement en présence d'acide ascorbique. 	SO ₃ ²⁻ , BHA, TBHQ, PG, 2-ME, NaN ₃ , CO, EDTA, MT, DETC, phosphatases (ATP et pyrophosphates), macromolécules (porphyrines, protéines), tropolone, mimosine, sulfate, pectine, H ₂ O ₂ , DTT, phénylhydrazine, ferrocyanure, glutathion, NH ₂ OH, acides (ascorbique, citrique, malique, gallique, oxalique, succinique, kojique)	e.g., Gunata <i>et al.</i> 1987, Dawley & Flurkey 1993, Kermasha <i>et al.</i> 1993, Montero <i>et al.</i> 2001a
Inhibiteurs agissant sur le site actif de l'enzyme où se fixent les substrats (inhibiteurs compétitifs)	<ul style="list-style-type: none"> • Certains acides possèdent des similarités structurales avec les phénoloxydases mais sont « peu oxydables ». • Sels halogénures: inhibition généralement dans des milieux acides. • Acides aminés, peptides et protéines : inhibition directe de l'enzyme, par chélation des ions cuivre ou réaction avec les quinones. Les histidines et les cystéines possèdent une forte affinité pour le Cu²⁺, grâce à leur groupement imidazole ou thiol. Les groupements thiols forment des adduits de sulfure avec les o-quinones qui inhibent la formation de polymères. 	NaBr, L-lysine, L-glycine, L-histidine et L-phénylalanine. Le 4-HR, l'acide kojique et la tropolone sont des chélateurs de métaux mais aussi des inhibiteurs compétitifs des PO.	e.g., Dawley & Flurkey 1993, Faure <i>et al.</i> 1995, Zufelato <i>et al.</i> 2004, Zavarzina & Zavarzin 2006
Inhibiteurs agissant dans d'autres sites (inhibiteurs non compétitifs)	<ul style="list-style-type: none"> • Aldéhydes: Ils attaquent les groupements aldéhydes présents dans la chaîne latérale des PO, conduisant à la formation de bases de Schiff stables 	Cuminaldéhyde, anisaldéhyde, 2-hydroxy-4-méthoxybenzaldéhyde, (2E)-alkénals	e.g., Jiménez <i>et al.</i> 2001
Inhibiteurs agissant sur les substrats des PO (agents absorbant les phénols)	<ul style="list-style-type: none"> • Agents absorbant les phénols, cyclodextrines, chitosans, autres polysaccharides anioniques: ces inhibiteurs ont une efficacité limitée. Ils forment des complexes avec les phénols. Les polymères de β-(1,4)-D-glucosamine sont dérivés de la désacétylation de la chitine chez les coquillages. Ces polymères inhibent les réactions où interviennent les PO en formant une barrière qui empêche le passage de l'oxygène. Ils se lient aux composés phénoliques mais aussi aux atomes de cuivre du site actif des PO. Les groupements sulfates peuvent se lier aux phénols ou être des chélateurs des ions cuivre. 	Charbon actif et bentonite, α, β, ou γ-cyclodextrine, carraghénanes, sulfates de xylane ou d'amylose, extraits d'algues	e.g., Simpson <i>et al.</i> 1997, Hellio <i>et al.</i> 2000
Inhibiteurs agissant sur les produits d'oxydation (quinones)	<ul style="list-style-type: none"> • Réduisent les quinones et génèrent les phénols parentaux (action antioxydante et antiradicalaire) en présence d'acide citrique, de métabisulfite de sodium, d'EDTA et d'ions chlorure. Mais leur effet est temporaire puisqu'ils sont oxydés par les quinones. La cystéine contient un acide aminé soufré qui piège les o-quinones sous forme de produits stables et incolores. 	Acides (gallique, ascorbique, fusarique, kojique), cystéine, arbutine, hinokitiol, barbarine, dérivés des flavonols, resvératrol, o-méthyl-transférases, oxygénases, quinone isomérasas et quinone méthide réductase, papaïne	e.g., Zhao <i>et al.</i> 2005

Par exemple, des molécules comme le 2-mercaptoéthanol (2-ME) sont décrites comme étant des inhibiteurs spécifiques des PO (Zhang & Flurkey 1997, Shatta & El-Shamei 1999). Cependant, de part son caractère d'agent réducteur, le 2-ME, peut provoquer une inhibition des réactions d'autooxydation et d'oxydation enzymatique en réagissant avec le substrat et/ou les quinones formées lors de ces deux types de réaction, et de ce fait ne pas exercer un effet inhibiteur direct sur l'enzyme (Polacheck *et al.* 1982). Par conséquent, les agents réducteurs ne devraient pas être considérés comme des inhibiteurs spécifiques des PO.

8. Les activateurs des phénoloxydases

Les PO peuvent être présentes dans les organismes sous forme constitutive ou induite, et des formes latentes ou inactives peuvent être activées dans l'organisme.

In vitro, l'activation des PO peut être réalisée de deux façons :

1) En passant de la **forme immature à la forme mature** : en utilisant des détergents tels que le sodium dodécyl sulfate (SDS) ou des protéases telles que la chymotrypsine ou la trypsine (ou de la trypsine traitée à la N-tosyl-L-phénylalanine chlorométhyl kétone, TPCK). Généralement, des détergents tels que le SDS dénaturent les protéines en modifiant leur structure tertiaire et quaternaire. La résistance des PO au SDS pourrait être due à la présence de deux ponts disulfure dans la région N-terminale de l'enzyme mature. En modifiant la conformation tridimensionnelle de l'enzyme, le SDS pourrait rendre le site actif des PO accessible au substrat (Decker & Terwillinger 2000). La maturation conduit à l'émergence de protéines (PO matures) ayant un poids moléculaire apparent plus faible que les formes natives. Les différences en poids moléculaire entre les formes matures et immatures peuvent être observées en gel d'électrophorèse (e.g., Perdomo-Morales *et al.* 2007).

2) En passant de la **forme inactive à la forme active** : chez les invertébrés, suite à une infection par un agent pathogène, la reconnaissance de motifs moléculaires PAMP, tels que les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries et les β -1,3-glucanes des champignons, mène, *via* un clivage protéolytique, à l'activation de la forme inactive de la proPO en forme active PO (Söderhäll & Cerenius 1998, Cerenius *et al.* 2008).

In vivo, les mécanismes d'activation des PO chez les bivalves restent à notre connaissance peu ou non connus. Cependant, certaines molécules telles que les lipopolysaccharides (LPS) ou la trypsine ont montré qu'elles activaient *in vitro* la proPO en PO (Luna-González *et al.* 2003, Hellio *et al.* 2007).

Ainsi, après avoir optimisé le protocole permettant de doser les activités PO, et réalisé une étude bibliographique approfondie sur les différents substrats, inhibiteurs et activateurs, nous nous sommes intéressés à identifier les activités PO présentes dans le plasma de *C. gigas*. Pour mener cette étude, différents substrats et différents inhibiteurs des PO ont été utilisés, puis, des méthodes d'activation variées de ces enzymes ont été testées.

9. Localisation cellulaire et tissulaire des phénoloxydases chez les bivalves

Chez les vertébrés, les PO sont actives uniquement dans des organites spécialisés : l'épithélium pigmenté de la rétine et les mélanocytes (Riley 1997). Chez les invertébrés tels que les bivalves, les activités PO ont été détectées dans les œufs (Bai *et al.* 1997), les hémocytes et le plasma (Luna-González *et al.* 2003, Cong *et al.* 2005, Jordan & Deaton 2005, Hellio *et al.* 2007), les branchies (Malanga & Young 1978, Jing *et al.* 2006), la glande digestive (Jing *et al.* 2006), le manteau (Waite & Wilbur 1976; Jones & Saleuddin 1978) et la coquille (Nagai *et al.* 2007).

Cependant, même si les PO ont été détectées dans différents tissus, la plupart des études chez les bivalves ont été réalisées dans le compartiment hémolympatique (e.g., Asokan *et al.* 1997, Pipe *et al.* 1999, Lacoste *et al.* 2001a, Luna-González *et al.* 2003, Gagnaire *et al.* 2004, Bouilly *et al.* 2006, Thiagarajan *et al.* 2006, Bado-Nilles *et al.* 2009). Pourtant, chez les bivalves, les PO jouent différents rôles en fonction du tissu étudié (**Tableau 9**), ce qui relève l'importance de s'intéresser à l'étude des PO dans différents tissus.

Chez *C. gigas*, des activités PO ont été détectées dans le plasma et dans les hémocytes (Luna-González *et al.* 2003, Hellio *et al.* 2007) et récemment, un gène codant pour une laccase a été identifié dans les hémocytes de cet organisme (Faury & Renault, pers. comm.).

Tableau 9 Localisation et rôle des PO dans différents tissus de bivalves.

Tissu	Rôle	Références
Hémocytes et plasma	Défenses immunitaires.	Jordan & Deaton 2005, Aladaileh <i>et al.</i> 2007b
Branchie	La dopamine est un inhibiteur potentiel des fibres cilio-excitatoires des branchies. Dans les branchies, la dopamine est transformée par des réactions catalysées par les phénoloxydases, conduisant à la formation de mélanine.	Paparo & Aiello 1970, Malanga & Young 1978
Glande digestive	Les phénoloxydases sont présentes dans une partie de la glande digestive appelée le style cristallin chez les lamellibranches mais leur rôle n'est pas connu.	Bailey & Worboys 1960
Manteau et coquille	Production et réparation de la coquille.	Liang <i>et al.</i> 2007
Pied	Les bivalves qui possèdent un pied peuvent s'attacher aux substrats grâce à des protéines tannées sécrétées par une série de glandes associées dans le pied. Les phénoloxydases présentes dans ces glandes sont impliquées dans la production des protéines tannées.	Bharathi & Ramalingam 1983

10. La structure quaternaire et le poids moléculaire des phénoloxydases chez les bivalves

Les tyrosinases des vertébrés forment des dimères tandis que les PO des invertébrés forment des monomères ou des oligomères (de dimères à pentamères ; Jaenicke & Decker 2003). Cette variabilité en termes de taille et de forme est dépendante du phylum et de l'organisme. Le poids moléculaire de ces PO a été déterminé à l'aide de techniques d'exclusion chromatographique ou d'électrophorèse sous conditions dénaturantes. Il varie de 10 à 400 kDa et chaque forme monomérique représente généralement 40 à 45 kDa. Chaque sous-unité possède deux atomes de cuivre (Prota *et al.* 1981). Chez les bivalves, le poids moléculaire des PO varie généralement entre 60 et 150 kDa (Cong *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2006, **Tableau 10**).

Tableau 10 extrait de l'Annexe 3 Poids moléculaire des PO des mollusques rapportés dans la littérature. HLS : surnageant de lysat hémocytaire ; HMS : surnageant des membranes hémocytaires.

Nom vernaculaire	Nom scientifique	Poids moléculaire (kDa)	Localisation	Référence
Escargot d'eau douce	<i>Biomphalaria glabrata</i>	35	Masse d'œuf	Bai <i>et al.</i> 1997
Poulpe commun	<i>Octopus vulgaris</i>	205	Encre	Prota <i>et al.</i> 1981
Poulpe ocellé	<i>Octopus ocellatus</i>	153,8	Encre	Fan <i>et al.</i> 2009
Calmar à courtes nageoires d'Argentine	<i>Illex argentinus</i>	127,6	Encre	Naraoka <i>et al.</i> 2003
Seiche commune	<i>Sepia officinalis</i>	125	Encre	Prota <i>et al.</i> 1981
Calmar européen	<i>Loligo vulgaris</i>	135	Encre	Prota <i>et al.</i> 1981
Moule bleue	<i>Mytilus edulis</i>	381, 316	HLS	Renwranz <i>et al.</i> 1996
Moule côtelée de l'Atlantique	<i>Modiolus demissus</i>	49, 135, 260	Glande du pied	Maruyama <i>et al.</i> 1991
Palourde japonaise	<i>Tapes (=Ruditapes) philippinarum</i>	70	Péριοstracum	Waite & Wilbur 1976
Huître perlière	<i>Pinctada fucata</i>	76,9	Hémolymph	Cong <i>et al.</i> 2005
Huître américaine	<i>Crassostrea virginica</i>	43, 49	Coquille	Nagai <i>et al.</i> 2007
		133	HMS	Jordan & Deaton 2005

11. Les méthodes utilisées pour déterminer la structure des phénoloxydases chez les bivalves

11.1. La purification

Pour précipiter les protéines, la méthode la plus utilisée est celle de la précipitation par les sels de sulfate d'ammonium (e.g., Cong *et al.* 2005).

Cette précipitation peut être suivie :

- d'une **chromatographie d'interactions hydrophobes** (e.g., Ingebrigtsen & Flurkey 1988, Richard-Forget *et al.* 1994, Espín *et al.* 2000) ;
- d'une **chromatographie échangeuse d'ions** (e.g., Cong *et al.* 2005).

Les deux méthodes sont souvent suivies d'une étape de dessalage par chromatographie d'exclusion de taille.

D'autres méthodes chromatographiques peuvent également être employées. Elles sont basées sur l'affinité pour un ligand couplé au gel, tels que:

- un **ion métallique** (chélation) (Richard-Forget *et al.* 1994) ;
- un **substrat**, un **inhibiteur** ou un **anticorps** (Richard-Forget *et al.* 1994).

De façon générale, les études permettant d'évaluer l'effet des contaminants sur les PO chez les bivalves sont réalisées avec des fractions non purifiées (**cf. Tableau 6**). A notre connaissance, seules quelques études avec de la PO purifiée ont été réalisées chez la moule bleue *M. edulis* (e.g., Hellio *et al.* 2000 ; **cf. Tableau 6**).

11.2. La zymographie

La zymographie est une technique qui consiste à réaliser une migration des protéines par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide, puis à incuber le gel avec le substrat de l'enzyme d'intérêt. La réaction enzymatique avec le substrat conduit à l'apparition d'un produit coloré à l'endroit où l'enzyme a migré. Cette technique a été utilisée dans certaines études sur les PO des bivalves en incubant les gels d'électrophorèse avec des substrats des PO (e.g., Jordan & Deaton 2005). En utilisant des marqueurs de poids moléculaire, la zymographie permet de réaliser assez rapidement une estimation du poids moléculaire des protéines responsables de l'activité PO, tout en évitant l'étape de purification.

11.3. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique permettant de caractériser des molécules chargées selon leur rapport masse sur charge (m/z). Elle peut être utilisée par exemple pour caractériser des protéines et des peptides. Suite à une digestion trypsique de l'échantillon, la spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption / ionisation / time-of-flight mass spectrometry), par exemple, permet de mesurer avec précision la masse des peptides issus de la séquence protéique. Chaque liste de masse obtenue correspond à une séquence protéique spécifique, la trypsine coupant toujours après une arginine, R, ou une lysine K (sauf si elles sont précédées d'une proline, P). La comparaison de la liste de masse obtenue par MALDI-TOF/TOF avec les listes de masses théoriques, calculées à partir des séquences protéiques des bases de données, permet d'identifier de façon fiable la protéine. Récemment, une étude a été publiée sur la caractérisation de protéines chez les bivalves possédant une activité PO, en réalisant une zymographie puis une analyse par spectrométrie de masse MALDI TOF/TOF (e.g., Simonian *et al.* 2009).

DEMARCHE SCIENTIFIQUE ET PRINCIPAUX RESULTATS

1. Optimisation du protocole de dosage des phénoloxydases chez *Crassostrea gigas*

1.1. L'approche cinétique

La première étape d'optimisation du protocole de dosage des PO chez *C. gigas* a consisté à vérifier que la mesure d'activité correspondait bien à une phase de la cinétique où l'enzyme travaillait en conditions de vitesse initiale. En effet, le protocole de dosage, qui a permis de mettre en évidence la présence d'une activité de type PO chez *C. gigas*, se basait sur une analyse spectrophotométrique en point final (Hellio *et al.* 2007). Cependant, la quantité de produit formé à un temps t (dosage discontinu) ne permet pas toujours de refléter la concentration en enzyme réelle. Il peut arriver qu'à une concentration d'enzyme plus importante, la réaction se réalise dans sa totalité ou atteint l'équilibre durant le temps utilisé pour le dosage. Dans ce cas, l'ajout d'enzyme supplémentaire n'engendrera pas une augmentation de la formation de produit, entraînant par conséquent, une potentielle sous-estimation de l'activité enzymatique (Pelmont 1995). En revanche, lorsque l'on réalise des analyses cinétiques en réalisant un dosage continu dans le temps, en vitesse initiale de réaction, le nombre de molécules de produit formé (ou de substrat disparu) en fonction du temps sera proportionnel à la concentration en enzyme.

Ainsi, il nous semblait opportun de procéder à une phase d'optimisation du dosage par la mise en œuvre de cinétiques témoins dans l'objectif de fixer les conditions optimales de cette catalyse. Ce type d'analyse a permis de diminuer les temps d'analyse par rapport à ce que pouvait rapporter la littérature : la mesure en point final était réalisée après que la réaction ait atteint l'équilibre, c'est-à-dire 21h après l'initiation de la réaction (Hellio *et al.* 2007). La méthode optimisée du dosage utilise le même substrat mais s'effectue désormais sur un temps de mesure de 5h, durée optimale autorisant le calcul de l'activité

enzymatique. Le protocole expérimental détaillé utilisé au cours de cette thèse pour l'ensemble des mesures d'activités enzymatiques PO est présenté en **Annexe 1**.

D'autre part, l'oxydation catalysée par les PO nécessite la présence d'O₂ et les substrats des PO sont rapidement autooxydés, c'est-à-dire oxydés en absence de l'enzyme, en contact avec l'air. Cette autooxydation conduit, de la même façon qu'en présence de PO, à la formation de quinones. De ce fait, il est important de réaliser aussi des analyses cinétiques contrôles en absence d'enzymes et en présence du seul substrat de la réaction. Les valeurs d'autooxydation ainsi obtenues devront être prises en compte pour le calcul final de l'activité enzymatique des échantillons.

1.2. Les inhibiteurs de protéases et leur interférence avec le dosage

Des inhibiteurs de protéases sont souvent ajoutés à l'échantillon où se trouvent les protéines d'intérêt, ceci afin d'éviter leur dégradation endogène. Cependant, parmi les inhibiteurs de protéases classiquement utilisés pour protéger les échantillons de leur dégradation, le fluorure de phénylméthanesulfonyl (PMSF) exerce un effet inhibiteur sur l'activité PO, et de ce fait tous les cocktails d'inhibiteurs dans lesquels le PMSF est présent doivent être proscrits (Aladaileh *et al.* 2007a). Le choix de ne pas utiliser d'inhibiteurs de protéases a donc été fait dans le cadre de cette thèse et dans l'objectif de pallier à une éventuelle dégradation des protéines de l'échantillon, l'ensemble des expériences préliminaires aux dosages a été conduite à une température $\leq 4^{\circ}\text{C}$.

1.3. Le choix du tampon

La composition du tampon est également très importante pour la mesure de l'activité enzymatique d'intérêt. Le tampon CAC 0,01 M, utilisé pour doser l'activité PO dans le protocole de Hellio *et al.* (2007), contient du citrate de trisodium, connu comme étant un inhibiteur des PO (Montero *et al.* 2001a, b). Dans un premier temps, le dosage a été réalisé avec du plasma de *C. gigas* et le substrat L-DOPA, en utilisant le protocole de dosage décrit en Annexe 1. Nous avons testé le tampon CAC, avec ou sans citrate de trisodium. Après avoir confirmé l'effet inhibiteur du citrate de trisodium, nous avons testé différents tampons (**Figure 22**):

- tampon CAC 0,01 M, pH 7,0 (0,01 M cacodylate de sodium) (Hellio *et al.* 2007) ;

- tampon PBS 0,1 M, pH 7,0 (0,2 M de phosphate de sodium monobasique NaHPO_4 , 0,2 M de phosphate de sodium dibasique Na_2HPO_4 , 150 mM de chlorure de sodium NaCl) (Maruyama *et al.* 1991) ;
- tampon Tris HCl 0,1 M, pH 7,0 (0,1 M d'hydrochlorure de tris(hydroxyméthyl)aminométhane) (Cong *et al.* 2005).

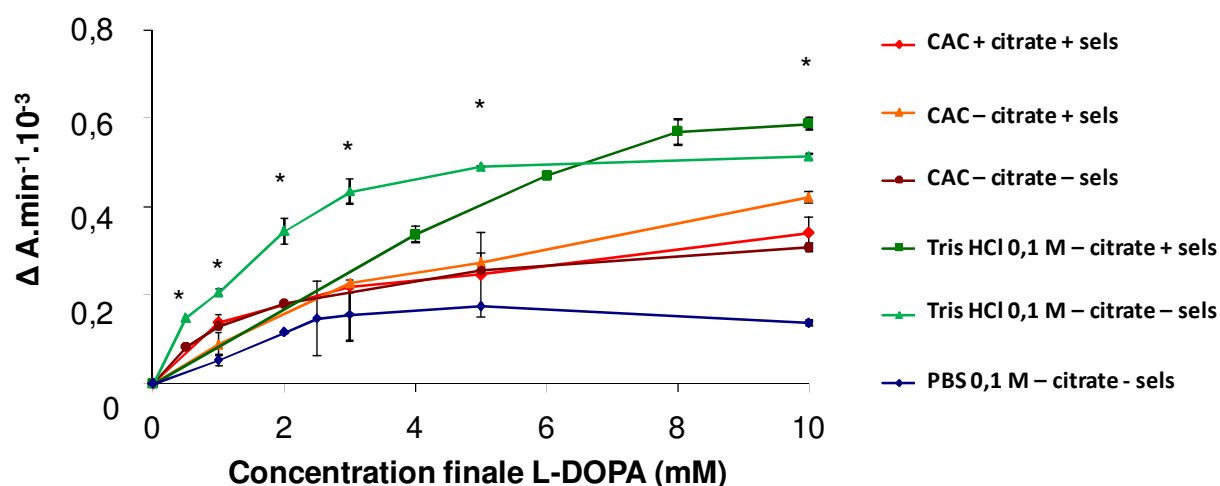


Figure 22 Effet de la nature du tampon sur l'activité PO. PBS à 0,1 M, pH 7,0 (tampon phosphate salin : 0,2 M de NaHPO_4 (phosphate de sodium monobasique), 0,2 M de Na_2HPO_4 (phosphate de sodium dibasique), 150 mM de NaCl (chlorure de sodium) ; CAC, pH 7,0 : 10 mM cacodylate de sodium; citrate : 100 mM citrate de trisodium ; sels : 450 mM de NaCl (chlorure de sodium), 26 mM de MgCl_2 (chlorure de magnésium), 10 mM de CaCl_2 (chlorure de calcium) ; Tris HCl 0,1 M, pH 7,0. Parallèlement, différentes concentrations en L-DOPA (0, 1, 2, 2,5, 3, 5, 10 mM) ont été testées afin de déterminer la concentration saturante en substrat à utiliser pour le dosage de la PO. Les expériences ont été réalisées à 25°C. Une unité d'activité enzymatique correspond à une augmentation d'absorbance de 0,001 par minute (Cong *et al.* 2005). Moyenne \pm ET $\Delta A.\text{min}^{-1}.10^{-3}$, $n = 9$ (trois réplicas de mesure sur trois pools d'hémolymphe différents, chaque pool étant constitué de 10 huîtres). *différence significative entre au moins deux conditions (tampons) pour $p < 0,05$.

Pour les tampons pour lesquels nous avons observé une activité de type PO plus élevée en comparaison aux autres tampons (tampon CAC et tampon Tris HCl), nous avons testé deux conditions : en ajoutant des sels (0,45 M de chlorure de sodium, NaCl , 26 mM de chlorure de magnésium, MgCl_2 , 10 mM de chlorure de sodium, CaCl_2) au tampon ou non.

Les activités enzymatiques ont été calculées en se basant sur la définition suivante : une unité d'activité enzymatique PO correspond à une augmentation de l'absorbance de 0,001

par minute ($A_{490} \cdot 10^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$; Cong *et al.* 2005). Puis, les moyennes et écart-types (ET) de ces activités enzymatiques ont été calculés par la suite. Les résultats obtenus avec ces différents tampons ont montré que le tampon Tris HCl 0,1 M contenant des sels était le plus approprié pour doser l'activité PO chez cet organisme (**Figure 22 ; Tableau 11**).

1.4. La définition de l'activité enzymatique et de l'unité d'activité enzymatique spécifique

Il existe, à notre connaissance, deux façons de définir une unité d'activité enzymatique PO. En effet, une unité d'activité enzymatique PO peut correspondre à :

- Une augmentation d'absorbance de 0,001 par minute (Cong *et al.* 2005) comme définit précédemment ;
- L'apparition d'une μmole de produit par minute (Pomerantz 1963).

Nous avons choisit pour la suite de notre étude d'utiliser la deuxième définition, car dans notre cas, nous avons travaillé avec différents substrats et que de ce fait, les produits issus des réactions d'oxydation catalysées par les PO ont des propriétés d'absorption différentes entre eux. Puis, dans le but de pouvoir comparer différents échantillons pour une même expérience, et entre différentes expériences, nous avons choisi de présenter nos résultats toujours par rapport à la quantité de protéines totales présentes dans l'échantillon.

Tableau 11 Récapitulatif des paramètres étudiés pour optimiser le protocole de dosage des activités phénoloxydase chez *Crassostrea gigas*.

Paramètres	Ancien protocole (Hellio <i>et al.</i> 2007)	Nouveau protocole (Luna-Acosta <i>et al.</i> 2010a)
Type d'analyse	Point final	Cinétique
Temps de réaction (avec L-DOPA)	21h	5h
Tampon	CAC contenant 100 mM de citrate de trisodium (inhibiteur des PO) et des sels (0,45 M NaCl, 26 mM MgCl ₂ , 10 mM CaCl ₂)	Tris HCl 0,1 M, pH, 7,0, contenant des sels (0,45 M NaCl, 26 mM MgCl ₂ , 10 mM CaCl ₂)
Définition de l'activité enzymatique	Augmentation de l'absorbance de 0,001 par minute (Cong <i>et al.</i> 2005)	Quantité d'enzyme capable de catalyser la production d'une μmole de produit par minute (Pomerantz 1963)
Unité d'activité enzymatique utilisée	A_{490}	$1 \mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ (Activité spécifique)

2. Identification des activités phénoloxydase dans le plasma de *Crassostrea gigas*

2.1. Utilisation de différents substrats des phénoloxydases

Suite à l'optimisation du protocole permettant de doser les activités PO, le second objectif de cette thèse a été d'identifier les différentes activités PO présentes dans l'hémolymphe de *C. gigas*, et plus particulièrement dans le plasma, où les plus hauts niveaux d'activité PO ont été détectés (Luna-González *et al.* 2003, Hellio *et al.* 2007).

L'identification des différentes activités PO peut être réalisée en utilisant différents substrats. En effet, les trois types de PO, tyrosinase, catécholase et laccase, sont capables de catalyser l'oxydation de substrats diphenoliques (tels que la L-DOPA ou la dopamine). Cependant, seules les tyrosinases sont capables de catalyser l'hydroxylation de substrats monophénoliques (tels que la L-tyrosine) et seules les laccases sont capables de catalyser l'oxydation de substrats non phénoliques tels que les amines aromatiques (comme par exemple la p-phénylènediamine ou PPD).

Les différents substrats choisis pour cette étude et les différentes concentrations testées sont présentés dans le **Tableau 12**. Ainsi, nous avons pu identifier différentes activités PO, avec des substrats diphenoliques tels que la L-DOPA et la dopamine et des substrats non phénoliques tels que la PPD, mais pas avec des substrats monophénoliques comme la L-tyrosine (**Tableau 12**). Ces résultats suggèrent alors la présence d'une activité catécholase et d'une activité laccase dans le plasma de *C. gigas*, puis l'absence d'une activité tyrosinase, avec les substrats que nous avons testés.

De plus, dans le cadre de cette thèse, 1) la valeur de K_m , qui correspond à l'affinité de l'enzyme pour le substrat et 2) la valeur V_m ou V_{max} , qui correspond à la vitesse maximale de catalyse, ont pu être déterminées. Chez *C. gigas* la valeur de K_m apparent ($K_{m_{app}}$) pour la L-DOPA obtenue dans cette étude est de 7 mM (**Tableau 12**). Ce résultat est en accord avec les valeurs de $K_{m_{app}}$ obtenues pour d'autres bivalves tels que la palourde *R. philippinarum*, et l'huître *Saccostrea glomerata*, de 2,2 et 10 mM, respectivement (Cong *et al.* 2005, Aladaileh *et al.* 2007a). A notre connaissance, les

valeurs de Km_{app} pour les substrats dopamine et PPD ont seulement été déterminées chez *C. gigas* (**Tableau 12**), et de ce fait n'ont pas pu être comparées aux valeurs de Km_{app} d'autres espèces de bivalves.

Tableau 12 extrait de l'Annexe 2 Identification de l'activité de type PO dans le plasma de *Crassostrea gigas*, en utilisant une large gamme de substrats. Les expériences ont été réalisées à 25°C. 4-HA : 4-hydroxyanisole ; PHPPA : acide p-hydroxyphényl propionique ; L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphénylalanine ; DHPPA : acide 3,4-dihydroxyphényl propionique ; ABTS : acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique ; PPD : p-phénylènediamine ; Ø : pas d'activité de type PO détectée.

Type de substrat	Substrat	λ (nm) ⁴	Concentrations finales testées (mM)	Concentration saturante en substrat (mM)	Km_{app} (mM)	Vm_{app} ($\Delta A \text{ min}^{-1} \cdot 10^{-3}$)
Monophéno ¹	L-tyrosine	490	4, 6, 8, 10, 20	Ø	Ø	Ø
	4-HA	490	4, 6, 8, 10, 20	Ø	Ø	Ø
	PHPPA	490	4, 6, 8, 10, 20	Ø	Ø	Ø
o-Diphéno ^{1,2,3}	L-DOPA	490	4, 6, 8, 10, 20	10	7	0,45
	Dopamine	490	10, 25, 50, 100, 200	100	51	0,51
	DHPPA	400	4, 6, 8, 10, 20	Ø	Ø	Ø
Méthoxyphéno ³	Syringaldazine	525	0,01, 0,1, 1	Ø	Ø	Ø
Substrats non phénoliques ³	ABTS	420	1, 2, 3, 4, 5	Ø	Ø	Ø
	PPD	420	5, 10, 25, 50, 100	50	45	0,59

¹ Substrat des tyrosinases, préparé dans du tampon Tris HCl 0,1 M, pH 7,0

² Substrat des catécholases, préparé dans du tampon Tris HCl 0,1 M, pH 7,0

³ Substrat des laccases, préparé dans du méthanol

⁴ Longueurs d'onde utilisées pour mesurer, par spectrophotométrie, la formation de chaque dérivé de quinone

Les PO catalysent l'oxydation de substrats phénoliques et non phénoliques, en présence d'O₂. Dans le but de vérifier si une consommation d'oxygène avait bien lieu au moment où l'on détectait une activité de type PO par spectrophotométrie, nous avons réalisé par la suite des études en oxymétrie (**Figure 23**). De plus, les peroxydases peuvent également catalyser l'oxydation de substrats phénoliques et non phénoliques, mais seulement en présence d' H₂O₂. Ainsi, en utilisant la catalase qui catalyse la transformation de H₂O₂ en O₂ et H₂O, et donc qui permet d'éliminer le H₂O₂ potentiellement présent dans le milieu réactionnel, des études en spectrophotométrie ont permis de confirmer que l'activité mesurée dans le plasma de *C. gigas* n'était pas d'origine peroxydasique (**Figure 24**).

Nous avons pu ainsi sélectionner un certain nombre de substrats, permettant de détecter les différentes activités PO présentes dans le plasma de *C. gigas*, tout en vérifiant que ces substrats sont bien utilisés lors de réactions catalysées par les PO et qu'ils ne sont pas utilisés par d'autres enzymes comme les peroxydases. Les concentrations saturantes en substrat, qui ont pu être déterminées lors de cette étude (**cf. Tableau 12**), ont été utilisées par la suite, de façon systématique, pour doser les activités PO. De plus, par rapport aux études réalisées précédemment, l'ensemble de ces résultats nous a permis

d'apporter une information supplémentaire sur les PO dans le plasma de *C. gigas*, à savoir la présence de deux types d'activité PO : laccase et catécholase, jamais décrit auparavant chez cette espèce. De plus, il s'agit de la première fois qu'une activité laccase est mise en évidence chez un mollusque bivalve marin, en utilisant un jeu de substrats et d'inhibiteurs spécifiques aux laccases.

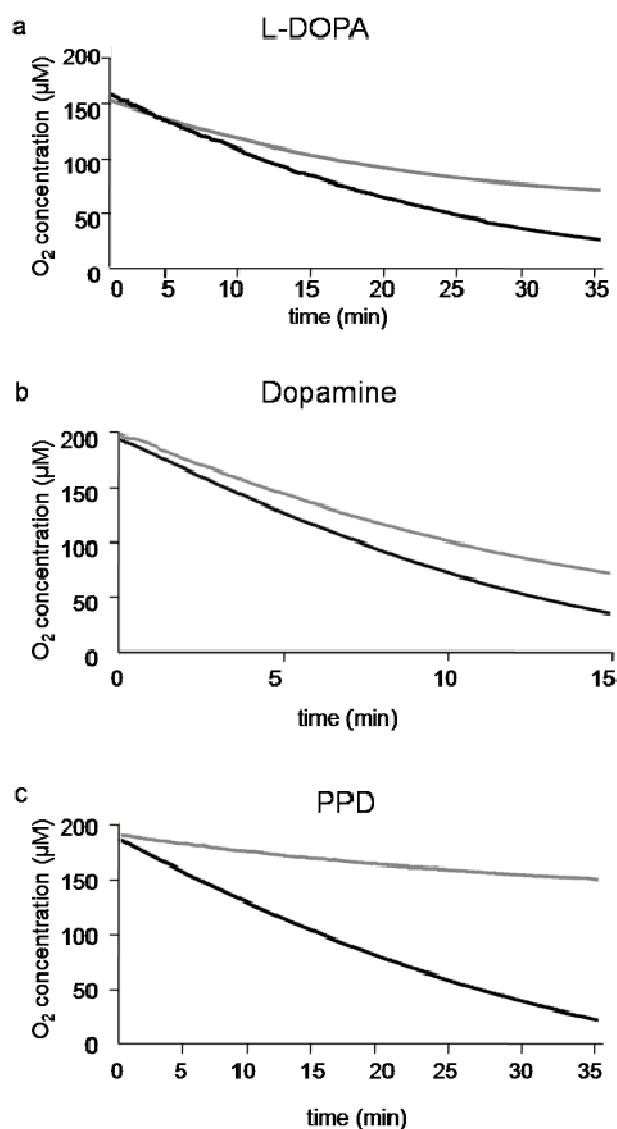


Figure 23 extraite de l'Annexe 2 Consommation d'oxygène durant la réaction d'oxydation des substrats des PO. Les réactions d'oxydation non enzymatiques (- plasma, lignes grises) et enzymatiques (+ plasma, lignes noires) ont été suivies en oxygraphie avec les substrats: (a) L-DOPA 10 mM, (b) dopamine 100 mM, et (c) PPD 50 mM. Les expériences ont été répétées trois fois pour chaque substrat. Pour une meilleure lisibilité, un seul réplica d'expérience est présenté sur la figure. Nous n'avons pas observé de consommation d'oxygène dans les contrôles contenant juste du tampon ou du tampon et du plasma en absence de substrat (données non montrées).

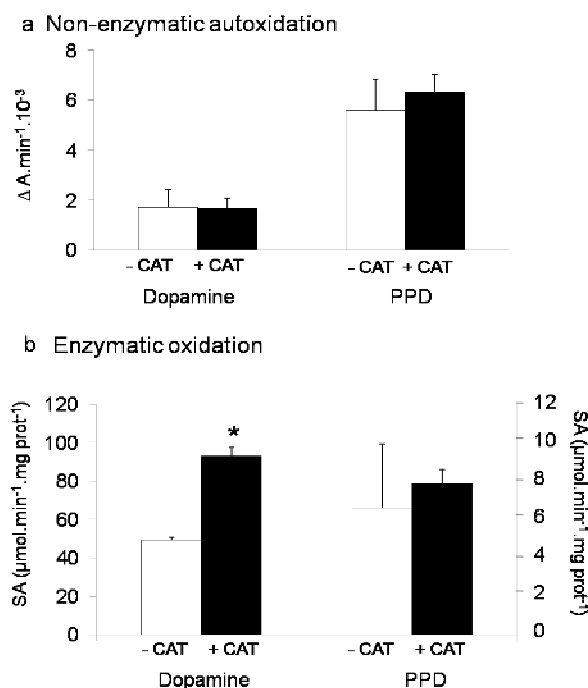


Figure 24 extraite de l'Annexe 2 Effets de la catalase sur l'autooxydation (a) et sur l'activité enzymatique de type PO (b). Les substrats dopamine et PPD ont été utilisés comme substrats en présence (+ CAT) ou en absence (- CAT) de catalase. L'axe des ordonnées située sur la gauche de chaque graphique correspond aux résultats obtenus avec la dopamine +/- CAT et l'axe de droite aux résultats obtenus avec la PPD +/- CAT. Moyenne \pm ET $\mu\text{mol} \text{min}^{-1} \text{mg} \text{prot}^{-1}$, $n = 9$, *différence significative pour $p < 0,05$.

2.2. Utilisation de différents inhibiteurs des phénoloxydases

L'étude bibliographique conduite a permis de sélectionner un certain nombre d'inhibiteurs des PO (**Tableau 13**). Systématiquement, leurs effets sur l'autooxydation puis sur l'oxydation enzymatique des substrats ont été étudiés (**Figure 25 et 26**). Les principaux résultats montrent que le 2-ME (5 mM), l'azoture de sodium (NaN_3 ; 0,1 ou 1 mM) et le diéthylthiocarbamate (DETC; 0,5 et 5 mM) exercent un effet sur l'autooxydation (**Figure 25 et 26**).

Au contraire, d'autres inhibiteurs des PO tels que la 1-phényl-2-thiourée (PTU), un inhibiteur spécifique de toutes les PO, le 4-hexylrésorcinol (4-HR), un inhibiteur spécifique des catécholases et le bromure de cetyltriméthyl ammonium (CTAB), un inhibiteur spécifique des laccases, n'exercent pas d'effet inhibiteur sur l'autooxydation et peuvent donc être utilisés pour identifier différents types de PO (**Figure 25 et 26**).

Tableau 13 Inhibiteurs de phénoloxydases choisis pour cette étude. DETC: diéthylthiocarbamate; PTU : 1-phényl-2-thiourée; 2-ME : 2-mercaptoéthanol ; NaN₃: azoture de sodium ; 4-HR : 4-hexylrésorcinol; SHAM: acide salicylhydroxamique; CTAB: bromure de cétyle triméthyl ammonium.

Inhibiteur	Mode d'action	Référence
DETC ^{1,2,3}	Chélation du cuivre (inhibition compétitive)	Johannes & Majcherczyk 2000, Jordan & Deaton 2005
PTU ^{1,2,3}	Chélation du cuivre (inhibition compétitive): le sulfure se lie au cuivre au niveau du site actif de l'enzyme, en bloquant l'accessibilité au substrat	Arias <i>et al.</i> 2003, Zufelato <i>et al.</i> 2004
Tropolone ^{1,2,3}	Substrat des peroxydases et inhibiteur des PO (chélation du cuivre)	Faure <i>et al.</i> 1995, Zufelato <i>et al.</i> 2004
2-ME ^{1,2,3}	Agent réducteur : les composés contenant du sulfure sont des chélateurs des quinones. Ils bloquent ainsi leur participation dans des réactions secondaires à la mélanisation et/ou en agissant directement avec l'enzyme.	Lee <i>et al.</i> 1997, Shatta & Ei-Shamei 1999
NaN ₃ ^{1,2,3}	Chélateur des métaux: inhibition de tous les types de PO	Faure <i>et al.</i> 1995, Zavarzina & Zavarzin 2006
4-HR ^{1,2}	Fixation sur le site actif : inhibition compétitive des tyrosinases et des catécholases mais pas des laccases	Dawley & Flurkey 1993, Zavarzina & Zavarzin 2006
SHAM ^{1,2}	Chélateur de métaux décrit comme un inhibiteur d'oxydases alternatives dans les plantes : inhibition compétitive des tyrosinases et des catécholases mais pas des laccases	Dawley & Flurkey 1993, Faure <i>et al.</i> 1995
Acide kojique ^{1,2,3}	Inhibition compétitive ou mixte des PO	Faure <i>et al.</i> 1995, Zhang & Flurkey 1997, Pérez-Gilbert & García Carmona 2000, Flurkey <i>et al.</i> 2008
CTAB ³	Détergent cationique : inhibition compétitive ou non compétitive des laccases, mais pas d'autres PO	Walker & McCallion 1980, Mazzafera & Robinson 2000, Martinez-Alvarez <i>et al.</i> 2008

¹ Inhibiteur des tyrosinases

² Inhibiteur des catécholases

³ Inhibiteur des laccases

La détection des activités catécholase et laccase dans le plasma de *C. gigas*, en utilisant respectivement les substrats dopamine et PPD, a pu alors être confirmée en utilisant le 4-HR comme inhibiteur spécifique des catécholases et le CTAB comme inhibiteur spécifique des laccases (**Figure 25 et 26; Annexe 2**).

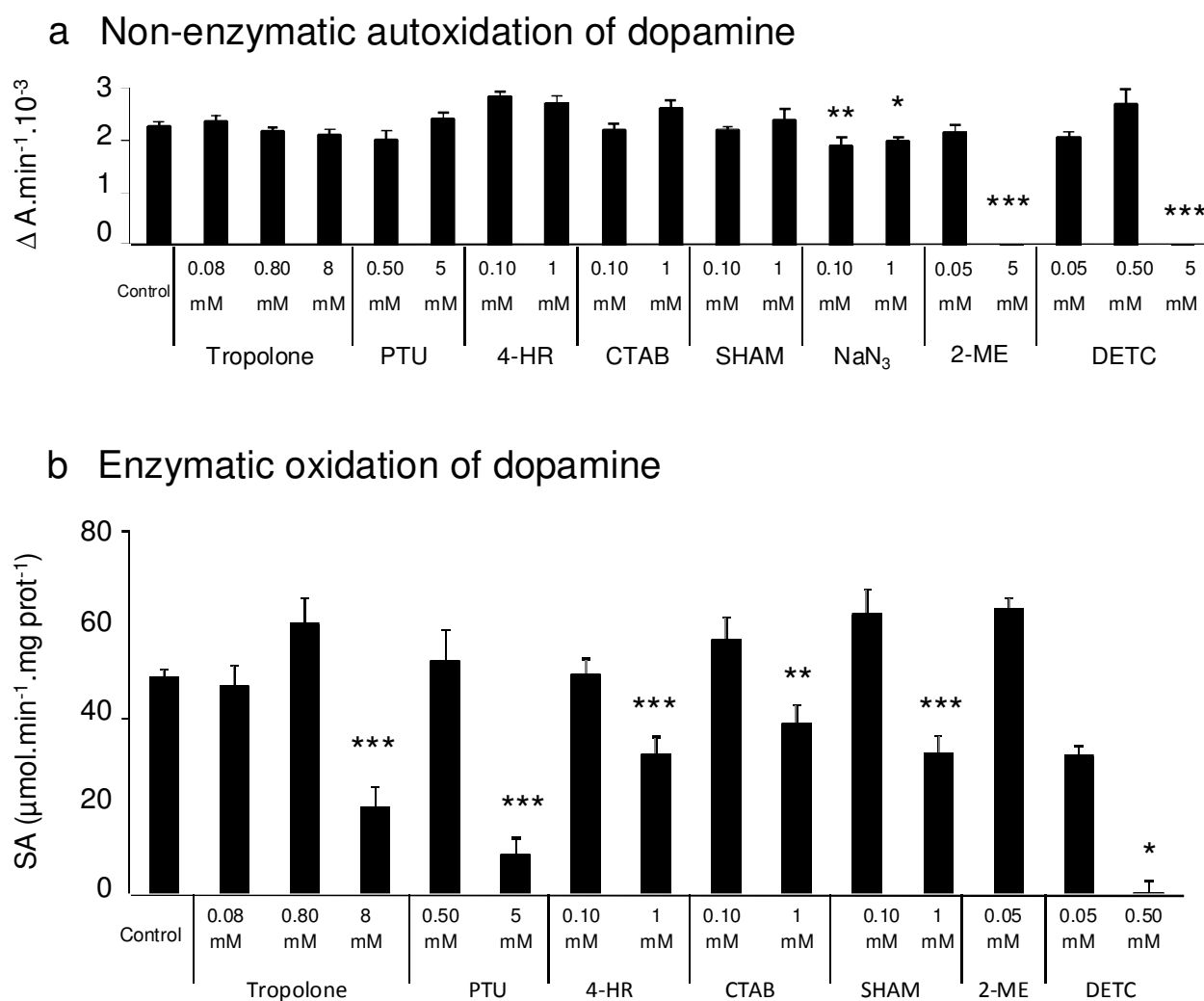
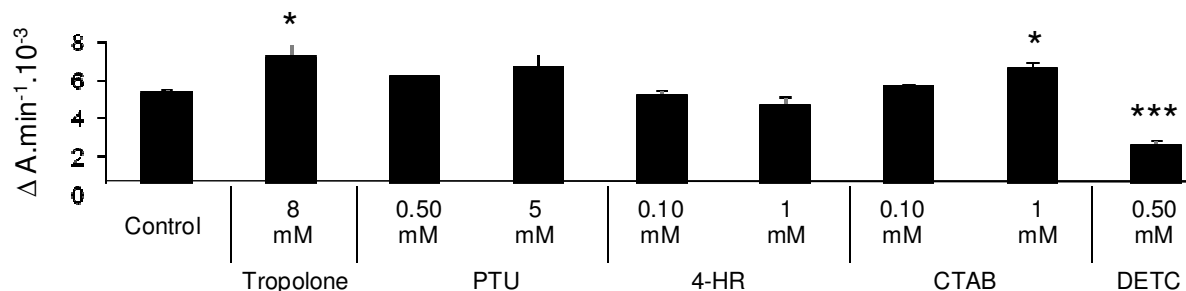


Figure 25 extraite de l'Annexe 2 Effets des inhibiteurs des phénoloxydases sur l'autooxydation et sur l'activité PO en présence de dopamine. **(a)** Autooxydation non enzymatique (sans plasma). **(b)** Oxydation enzymatique (avec plasma). Les expériences ont été réalisées à 25°C, avec du tampon Tris HCl 0,1 M, pH 7,0. Le terme « Control » correspond à la condition contrôle, sans inhibiteur. Les concentrations des inhibiteurs de PO correspondent aux concentrations finales utilisées dans le test. Moyenne ± ET μmol min⁻¹ mg prot⁻¹, n = 9, *différence significative pour p < 0,05, **p < 0,01 et ***p < 0,001, respectivement.

a Non-enzymatic autoxidation of PPD



b Enzymatic oxidation of PPD

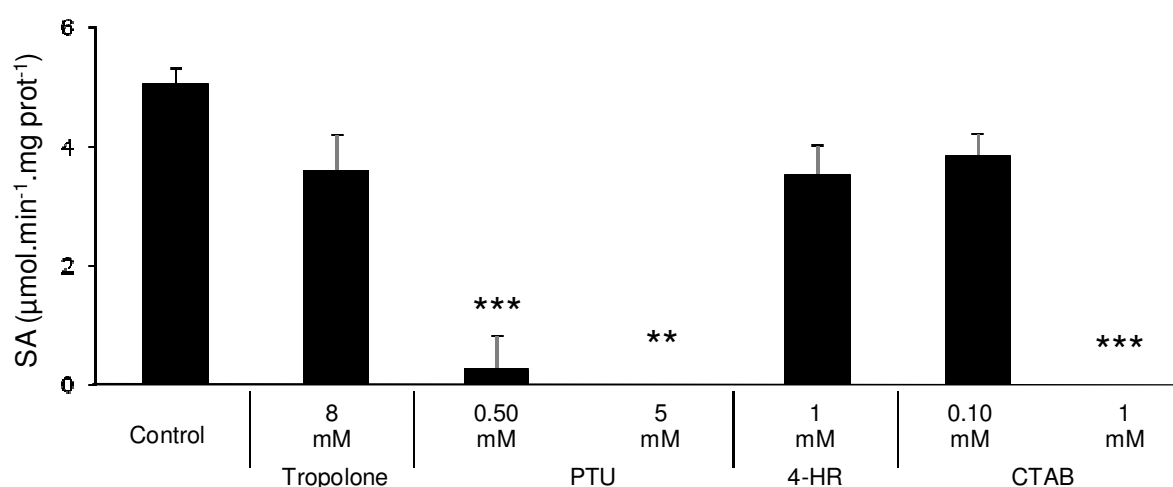


Figure 26 extraite de l'Annexe 2 Effets des inhibiteurs des phénoloxydases sur l'autooxydation et sur l'activité PO en présence de PPD. (a) Autooxydation non-enzymatique (sans plasma). (b) Oxydation enzymatique (avec plasma). Les expériences ont été réalisées à 25°C, avec du tampon Tris HCl 0,1 M, pH 7,0. Le terme « Control » correspond à la condition contrôle, sans inhibiteur. Les concentrations des inhibiteurs de PO correspondent aux concentrations finales utilisées dans le test. Moyenne ± ET μmol min⁻¹ mg prot⁻¹, n = 9, *différence significative pour p < 0,05, **p < 0,01 et ***p < 0,001, respectivement.

En présence de PPD, la réaction d'autooxydation est inhibée en présence de LPS (à 1 mg.ml⁻¹) et de SDS (à 0,10 % (w/v); **Figure 28a**). En présence de plasma brut de *C. gigas*, la réaction d'oxydation enzymatique est stimulée en présence de trypsine-TPCK (à 0,10 mg.ml⁻¹), et inhibée en présence de SDS (à 0,10% (w/v); **Figure 28b**).

Les résultats suggèrent que des activateurs des PO peuvent exercer un effet inhibiteur sur les réactions d'autooxydation ou d'oxydation enzymatique, en fonction du produit et de la concentration utilisés. Comme les résultats d'oxydation enzymatique (en présence de l'activateur) sont systématiquement corrigés par rapport aux résultats d'autooxydation

non enzymatique du substrat (en présence de l'activateur), si une molécule réduit l'autooxydation, les résultats sur l'oxydation enzymatique peuvent être interprétés à tort comme une activation de la réaction enzymatique par la molécule testée. Par exemple, en présence de dopamine, la trypsine-TPCK à 0,25 mg.ml⁻¹ inhibe la réaction d'autooxydation (**Figure 27a**), ce qui peut expliquer une augmentation de l'activité enzymatique observée en présence de trypsine-TPCK par rapport au contrôle (**Figure 27b**). Il est difficile de comparer ces résultats avec d'autres études sur *C. gigas*, puisque les méthodes de dosage des PO que nous avons utilisées (**Annexe 1 et 2**) diffèrent des études répertoriées dans la littérature (Luna-González *et al.* 2003, Hellio *et al.* 2007). De plus, nous n'avons trouvé aucune étude qui discute l'effet des activateurs de PO sur les réactions d'autooxydation.

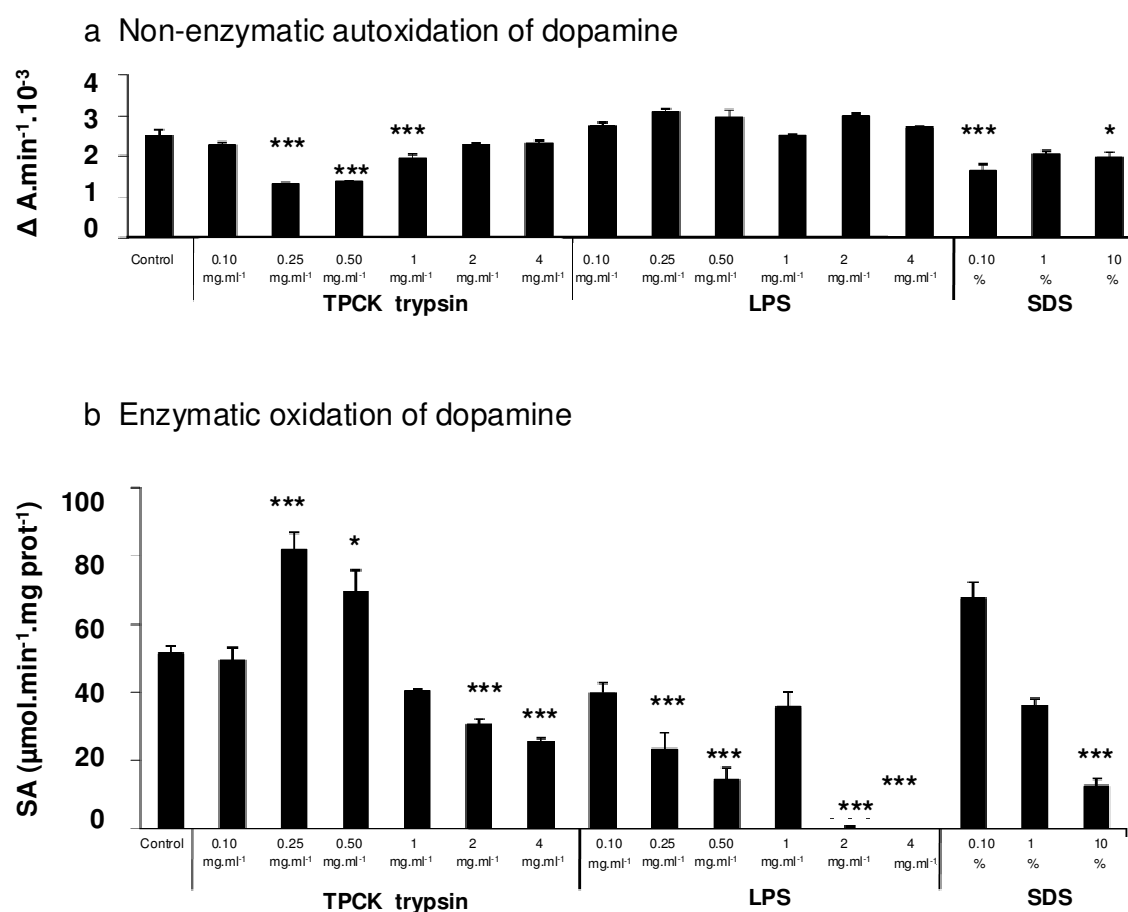


Figure 27 Effet des activateurs des phénoloxydases sur l'autooxydation et l'oxydation enzymatique de la dopamine. **(a)** Autooxydation (sans plasma). **(b)** Oxydation enzymatique (avec plasma). Les expériences ont été réalisées à 25°C, avec du tampon Tris HCl 0,1 M, pH 7,0. 'Control' correspond à la condition sans activateur. Les concentrations indiquées sur la figure correspondent aux concentrations initiales en activateurs utilisées pour chaque expérience. Moyenne ± ET μmol min⁻¹ mg prot⁻¹, n = 9, *différence significative pour p < 0,05 et *** pour p < 0,001. SA: activité spécifique.

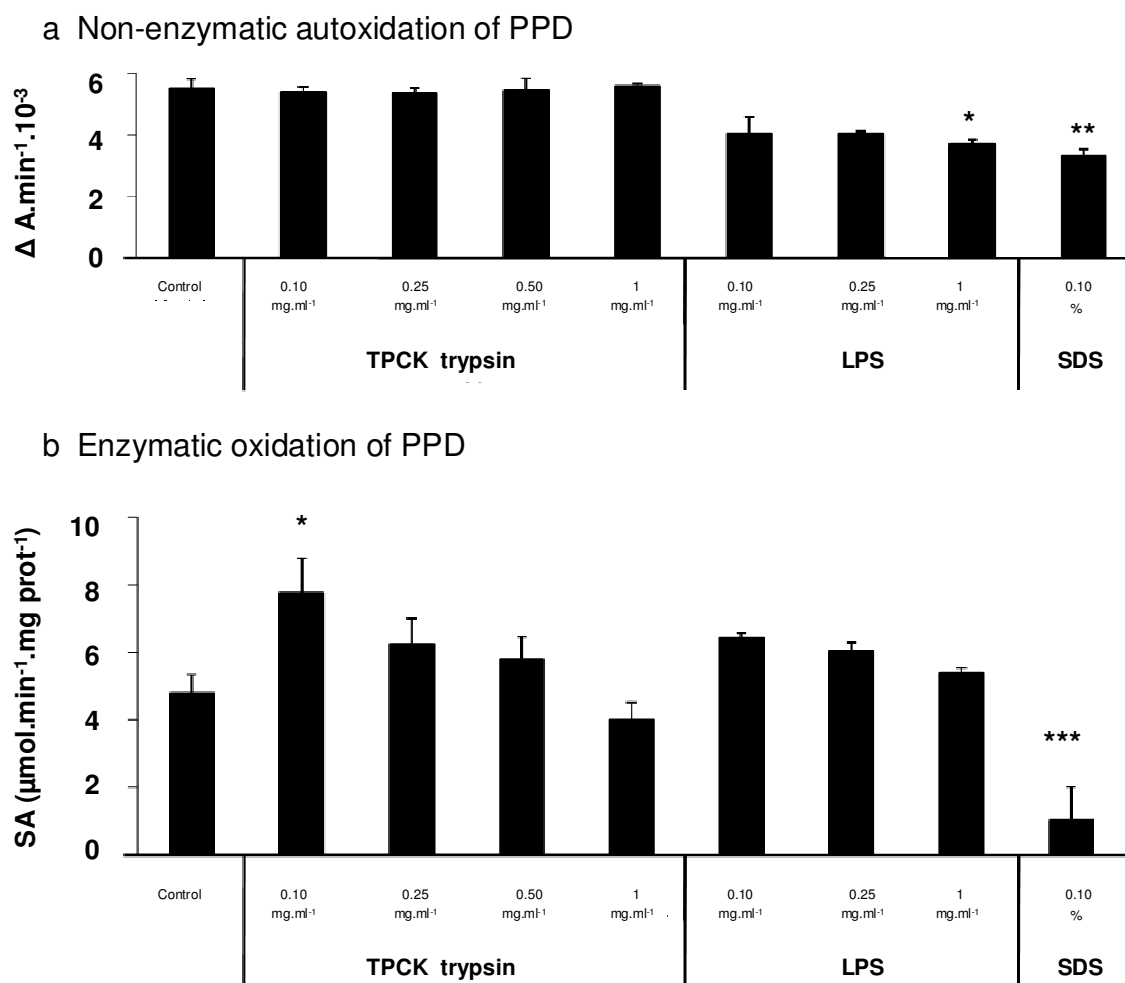


Figure 28 Effet des activateurs des phénoloxydases sur l'autooxydation et l'oxydation enzymatique de la PPD. (a) Autooxydation (sans plasma). (b) Oxydation enzymatique (avec plasma). Les expériences ont été réalisées à 25°C, avec du tampon Tris HCl 0,1 M, pH 7,0. 'Control' correspond à la condition sans activateur. Les concentrations indiquées sur la figure correspondent aux concentrations initiales en activateurs utilisées pour chaque expérience. Moyenne \pm ET $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$, $n = 9$, *différence significative pour $p < 0,05$ et *** pour $p < 0,001$. SA: activité spécifique.

En revanche, une augmentation de l'activité PO n'impliquant pas d'inhibition de l'autooxydation a été observée en présence de trypsine-TPCK (à $0,10 \text{ mg.ml}^{-1}$) avec la PPD comme substrat. Ce résultat suggère qu'une forme inactive de laccase, c'est-à-dire une pro-laccase, pourrait être présente dans le plasma de *C. gigas*, et qu'elle serait activée par la trypsine-TPCK. Ces résultats sont en accord avec les résultats d'autres auteurs

concernant l'activation des pro-laccases par la trypsine (Germann *et al.* 1988, Yatsu & Asano 2009).

Dans le cas de notre étude, nous avons observé généralement que les activateurs avait un effet inhibiteur sur les réactions d'autooxydation ou d'oxydation des substrats des PO, et qu'ils étaient généralement dose-dépendants. De ce fait, de plus faibles concentrations que celles utilisées dans notre étude pourraient avoir un effet activateur et non inhibiteur. De plus, d'autres activateurs des PO tels que la chymotrypsine ou le Triton X-100 pourraient être des activateurs des PO chez *C. gigas*.

En conclusion, les résultats obtenus au cours de cette thèse sur l'activation des PO chez *C. gigas* constituent des résultats préliminaires. En effet, avec les résultats que nous avons obtenus en présence d'inhibiteurs et d'activateurs des PO, il reste difficile d'affirmer que l'activité catécholase présente dans le plasma de *C. gigas* est due 1) à une activité PO présente de façon constitutive dans le plasma, ou bien 2) si elle est due à un clivage protéolytique à l'extérieur des hémocytes d'une proPO présente dans les hémocytes, ou bien encore 3) si elle résulte d'un clivage protéolytique d'une proPO présente dans les hémocytes et exportée dans le plasma.

L'optimisation du protocole de dosage des PO dans le cadre de cette thèse a permis de répondre à différents questionnements sur l'activité de type PO présente dans le plasma de *C. gigas*. L'ensemble de ces questionnements ainsi que les réponses que nous avons pu apporter sont résumés dans le **Tableau 14**.

Puisque des activités PO ont également été détectées dans d'autres compartiments hémolymphatiques de *C. gigas*, tels que les hémocytes (Luna-González *et al.* 2003, Hellio *et al.* 2007), nous avons choisi de poursuivre notre étude en réalisant la même démarche d'identification des activités PO dans les hémocytes de *C. gigas*, puis dans différents tissus, autres que l'hémolymphe, susceptibles d'être impactés de façon différentielle par la présence de contaminants dans le milieu.

Tableau 14 Récapitulatif des principales questions auxquelles nous avons pu répondre dans le cadre de cette thèse sur l'activité de type PO présente dans le plasma de *Crassostrea gigas*. 4-HA : 4-hydroxyanisole ; PHPPA : acide p-hydroxyphényl propionique ; L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphénylalanine ; DHPPA : acide 3,4-dihydroxyphényl propionique ; PTU : 1-phényl-2-thiourée ; 4-HR : 4-hexylrésorcinol ; ABTS : acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique ; PPD : p-phénylènediamine ; Trypsine-TPCK : trypsine traitée à la TPCK ou N-tosyl-L-phénylalaninyl chlorométhyl kêtone; LPS : lipopolysaccharide; SDS : sodium dodécyl sulfate ; ✓ : oui ; ✗ : non.

Question	Méthodes utilisées pour répondre à la question		Réponse à la question
Y a-t-il une consommation d'O ₂ lorsque l'on dose une activité de type PO dans le plasma de <i>C. gigas</i> ?	Oxymétrie		✓
L'activité de type PO détectée dans le plasma de <i>C. gigas</i> est elle due à une peroxydase ?	Spectrophotométrie + ajout de catalase (catalyse la transformation de H ₂ O ₂ en O ₂ et H ₂ O)		✗
Est-ce que l'on détecte une activité de type crésolase ?	Substrats	4-HA PHPPA L-tyrosine	✗ ✗ ✗
Est-ce que l'on détecte une activité de type catécholase ?	Substrats	L-DOPA Dopamine DHPPA	✓ ✓ ✗
	Inhibiteurs	PTU ¹ 4-HR ²	✓ ✓
Est-ce que l'on détecte une activité de type laccase ?	Substrats	Syringaldazine ABTS PPD	✗ ✗ ✓
	Inhibiteurs	PTU ¹ CTAB ³	✓ ✓
Est-ce qu'il y aurait présence d'une pro-catécholase ?	Activateurs	Trypsine-TPCK ⁴ LPS ⁴ SDS ⁴	✗* ✗# ✗*
Est-ce qu'il y aurait présence d'une pro-laccase ?	Activateurs	Trypsine-TPCK ⁴ LPS ⁴ SDS ⁴	✓ ✗* ✗*

¹ Effet inhibiteur de l'activateur de PO utilisé sur la réaction d'autooxydation

[#] Effet inhibiteur de l'activateur de PO utilisé sur la réaction enzymatique

¹ Inhibiteur de toutes les PO

² Inhibiteur des catécholases

³ Inhibiteur des laccases

⁴ Activateur de toutes les PO

3. Identification et caractérisation partielle des activités PO dans d'autres compartiments hémolymphatiques et tissus de *Crassostrea gigas*

Suite à l'identification des activités PO dans le plasma, nous avons poursuivi l'identification des activités PO dans les hémocytes et dans des tissus autres que l'hémolymphe chez *C. gigas*. Nous avons cherché également à caractériser les protéines responsables de ces activités PO. Pour ceci, nous avons procédé en trois étapes :

1) **La première étape** a consisté à identifier des activités PO dans les hémocytes de *C. gigas*. Pour cela, nous avons utilisé la même démarche que celle présentée précédemment, c'est-à-dire l'utilisation de différents substrats et inhibiteurs des PO. Afin de réaliser une caractérisation des protéines responsables des activités PO, nous avons procédé à une précipitation des protéines au sulfate d'ammonium à 60% (m/v) de saturation.

2) **La deuxième étape** a consisté à identifier les activités PO présentes dans différents tissus de *C. gigas*, à savoir les branchies, la glande digestive, le manteau et le muscle. Pour cela, nous avons réalisé la même démarche que dans la première étape présentée ci-dessus.

3) **La troisième étape** a consisté à caractériser les activités PO présentes dans les différents tissus et compartiments hémolymphatiques de *C. gigas*, en utilisant les techniques de zymographie et de spectrométrie de masse MALDI TOF/TOF.

3.1. Identification des activités phénoloxydase dans d'autres compartiments hémolymphatiques, les hémocytes

Suite à l'identification des activités PO dans le plasma de *C. gigas*, nous avons cherché à identifier les activités PO dans les hémocytes. Dans le but de réaliser une identification plus fine, nous avons réalisé une purification partielle au sulfate d'ammonium à 60% (m/v) de saturation. Les dosages ont été réalisés avec les substrats L-tyrosine (10 mM), dopamine (100 mM) et PPD (50 mM) et les inhibiteurs PTU (5 mM), 4-HR (1 mM) et CTAB (1 mM). Nous avons détecté une activité de type PO en utilisant les substrats dopamine et PPD mais pas L-tyrosine. En présence de dopamine ou de PPD, l'activité de type PO a été inhibée en présence de PTU et de CTAB mais pas de 4-HR.

L'ensemble des résultats, indépendamment du substrat utilisé, suggère la présence d'une PO de type laccase dans les hémocytes de *C. gigas* (**Figure 29**). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans les fractions partiellement purifiées de plasma où l'on détecte, en plus d'une activité laccase, une activité enzymatique de type catécholase (**Figure 29**; **Tableau 15**).

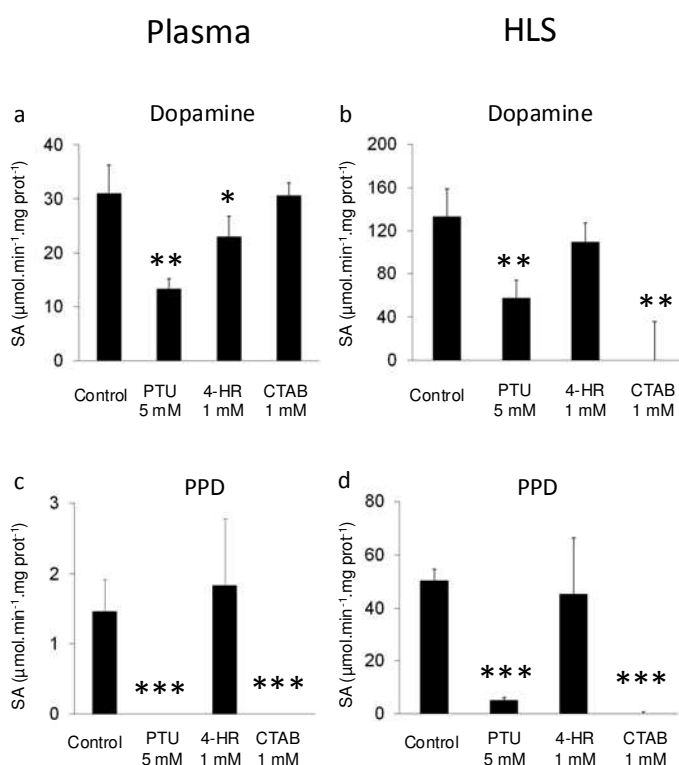


Figure 29 extraite de l'Annexe 2 Inhibition de l'activité de type phénoloxydase sur des fractions de protéines précipitées du plasma et du HLS. Les substrats dopamine (a, b) et PPD (c, d) ont été utilisés comme substrats. Les expériences ont été réalisées à 25°C, avec du tampon Tris HCl 0,1 M, pH 7,0. 'Control' correspond à la condition contrôle sans inhibiteur. Les concentrations en inhibiteurs des PO indiquées sur la figure correspondent aux concentrations finales utilisées dans le test. Moyenne \pm ET $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$, $n = 9$, *différence significative pour $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$, respectivement.

Tableau 15 Synthèse des PO identifiées dans l'hémolymphe de *Crassostrea gigas*.

Compartiment	Enzyme	Phénoloxydases		
		Tyrosinase	Catécholase	Laccase
Plasma		X	✓	✓
HLS		X	X	✓

✓ Présence

X Absence

HLS : surnageant de lysat hémocytaire

3.2. Identification des activités phénoloxydase dans d'autres tissus : les branchies, la glande digestive, le manteau et le muscle

Nous avons utilisé la même démarche que celle présentée précédemment pour identifier les activités PO présentes dans différents tissus de *C. gigas*. Les analyses ont été réalisées au niveau des branchies, de la glande digestive, du manteau et du muscle, en utilisant les substrats L-tyrosine (10 mM), dopamine (100 mM) ou PPD (50 mM) et les inhibiteurs PTU (5 mM), 4-HR (1 mM) et CTAB (1 mM).

L'ensemble des résultats suggère que des activités catécholase et laccase sont présentes dans le muscle, tandis que des activités laccases sont présentes dans les branchies, la glande digestive et le manteau (**Tableau 16 ; Annexe 3**).

Tableau 16 Identification des PO identifiées dans différents tissus de *Crassostrea gigas*

Tissu	Enzyme	Phénoloxydases		
		Tyrosinase	Catécholase	Laccase
Branchies		X	X	✓
Glande digestive		X	X	✓
Manteau		X	X	✓
Muscle		X	✓	✓

✓ Présence
 X Absence

3.3. Caractérisation des phénoloxydases chez *C. gigas*

En réalisant une zymographie sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE avec des substrats des PO tels que la dopamine ou la PPD, des bandes correspondant à des protéines de différents poids moléculaire peuvent être détectées, et ceci en fonction du tissu ou du compartiment hémolympatique étudié (Cardenas & Dankert 2000, Dicko *et al.* 2002, Jordan & Deaton 2005).

En utilisant la dopamine et la PPD comme substrats des PO, nous avons observé en zymographie trois bandes principales correspondant à des protéines de poids moléculaire de 10, 40 et 200 kDa. Ces bandes sont à la fois tissus- et substrats-spécifiques. Les différences entre les tissus pourraient être dues à la présence de différentes protéines possédant une activité PO (**Tableau 17 ; Annexe 3**).

Afin de poursuivre la caractérisation des PO chez *C. gigas*, une identification protéique par spectrométrie de masse a été entreprise (**Figure 30 ; Annexe 3**). Les résultats ont montré que les peptides extraits des bandes basses des échantillons de manteau et de HLS possédaient une homologie de 100% avec la cavortine (**Tableau 17 ; Annexe 3**), ce qui suggère que certaines bandes où des activités PO ont pu être détectées chez l'huître pourraient correspondre à des cavortines ou bien être co-éluées avec des cavortines.

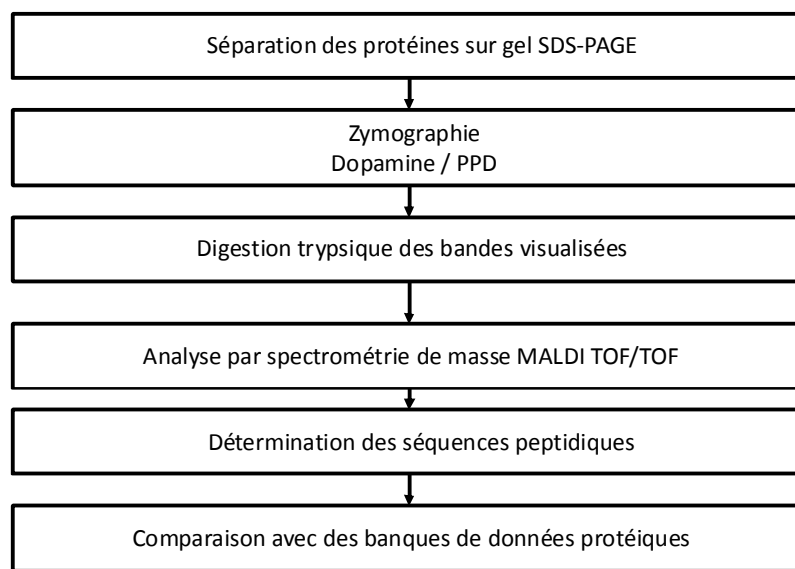


Figure 30 Démarche entreprise pour l'identification protéique des PO chez *Crassostrea gigas*.

La cavortine a été décrite comme une protéine majoritaire de l'hémolymphe de *C. gigas* (Scotti *et al.* 2007), et il a été suggéré qu'elle présente une activité de type PO chez l'huître *S. glomerata* (Simonian *et al.* 2009). La cavortine comporte 174 acides aminés, pour un poids moléculaire de 19,4 kDa. Elle est riche en histidine et en acide aspartique. Elle est constituée d'un domaine dérivé de la Cu/Zn superoxyde dismutase (Cu/Zn SOD), et possède une homologie importante avec chacun des trois domaines de type SOD de la perline (GenBank Acc. No. AF273766), protéine de 60 kDa équivalente à la cavortine chez la moule *Perna canaliculus* (Scotti *et al.* 2001). Cependant, malgré l'homologie de structure avec la SOD, la cavortine ne semble pas posséder de fonction SOD (Scotti *et al.* 2007). En fait, la fonction de la cavortine reste méconnue. Cependant, ces protéines qui ont persisté au cours de l'évolution sont présentes à de fortes concentrations dans l'hémolymphe et leurs séquences en acides aminés sont fortement conservées, suggérant que les cavortines jouent un rôle crucial dans les fonctions biologiques. Une étude

réalisée sur *C. gigas* par Huvet *et al.* (2004) a montré que les cavortines sont fortement exprimées dans des huîtres qui sont plus résistantes aux phénomènes de mortalité estivale, en comparaison à des populations plus sensibles. Ces résultats suggèrent que la cavortine pourrait jouer un rôle dans la résistance aux mortalités estivales (Huvet *et al.* 2004). Par ailleurs, d'autres auteurs ont remarqué une expression différentielle du gène codant pour la cavortine de *C. virginica* en réponse à une infection des huîtres avec le protozoaire *Perkinsus marinus*, renforçant l'hypothèse que la cavortine jouerait un rôle dans les mécanismes de défense (Tanguy *et al.* 2004).

Cependant, dans le cadre de notre étude, de fortes homologues ont été également trouvées avec des protéines telles que l'actine ou la myosine dans les échantillons de branchies, de glande digestive et de muscle. Ainsi, ces homologues observées avec des protéines majoritairement présentes dans les tissus (actine, myosine, cavortine), pourraient masquer la présence de PO, de poids moléculaire relativement équivalent, qui migreraient au même niveau que ces protéines majoritaires. De plus, de nombreux gènes n'ont pas encore été séquencés chez cette espèce, et de ce fait, les séquences des protéines pour lesquelles codent ces gènes ne sont pas présents dans les banques de données des séquences protéiques que nous avons utilisées pour identifier nos séquences peptidiques.

Dans tous les cas, les résultats présentés dans cette partie sont préliminaires et des études supplémentaires sont indispensables pour caractériser les PO présentes chez *C. gigas*. En résumé, nous avons pu identifier différentes activités PO en fonction du tissu analysé, qui sembleraient être dues à des protéines de poids moléculaire variés, de 10, 40 et 200 kDa et jouant probablement des rôles différents chez *C. gigas*. L'ensemble des principaux résultats est synthétisé dans le **Tableau 17**.

Tableau 17 Bilan de l'identification et de la caractérisation des activités de type PO dans les tissus et les compartiments hémolymphatiques de *Crassostrea gigas*.

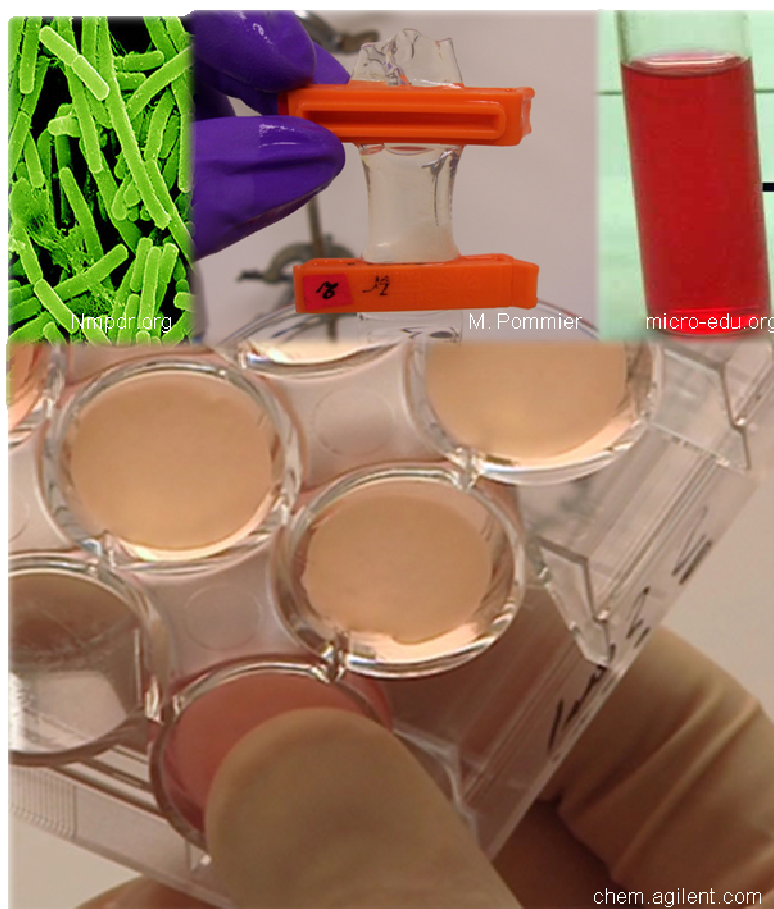
Tissu ou compartiment hémolymphatique	Activité PO			Enzyme			Poids moléculaire estimé en fonction du substrat utilisé en zymographie			Homologie avec des protéines de l'huître
	Crésolase	Catécholase	Laccase	Tyrosinase	Catécholase	Laccase	L-tyrosine	Dopamine	PPD	
Branchies	X	✓	✓	X	X	✓	X	200 kDa 10 kDa	200 kDa 10 kDa	X X
Glande digestive	X	✓	✓	X	X	✓	X	200 kDa	10 kDa	X X
Manteau	X	✓	✓	X	X	✓	X	200 kDa 10 kDa	200 kDa 10 kDa	X Cavortine
Muscle	X	✓	✓	X	✓	✓	X	40 kDa	40 kDa	X
Plasma	X	✓	✓	X	✓	✓	X	10 kDa	10 kDa	X
HLS	X	✓	✓	X	X	✓	X	10 kDa	10 kDa	Cavortine

✓ Présence

X Absence

HLS : surnageant de lysat hélocytaire

Partie 2 : Implication des phénoloxydases dans les mécanismes de défense immunitaire de *Crassostrea gigas*



CONTEXTE SCIENTIFIQUE

1. Le rôle du système proPO chez les invertébrés

Chez les invertébrés, le système proPO est supposé être impliqué dans la reconnaissance du non-soi puisque, lors d'une infection par un agent pathogène, la reconnaissance de PAMP par des protéines du soi va déclencher la cascade d'activation du système proPO.

De plus, les PO sont impliquées dans la réponse immunitaire innée à médiation humorale. En effet, la mélanine et ses intermédiaires (quinones), produits par le système proPO, empêchent la croissance de microorganismes en inhibant des mécanismes de défense de l'agent pathogène utilisés lors de l'infection de l'hôte, tels que des protéases ou des chitinases (Söderhäll & Cerenius 1998, Johansson 1999). De plus, les quinones issues de cette action possèdent des fonctions bactéricides, fongicides et/ou virucides. Les quinones peuvent aussi intervenir dans la réparation des blessures, et de par leur capacité de polymérisation, participent à la formation de capsules de mélanine autour des parasites (Söderhäll & Cerenius 1998, Johansson 1999, Cerenius *et al.* 2008).

Les PO jouent également un rôle au cours de la réponse immunitaire innée à médiation cellulaire. En effet, les composés cytotoxiques intermédiaires issus des réactions d'oxydation catalysées par les PO interviennent au niveau de la communication cellulaire pour initier les activités des hémocytes telles que la phagocytose ou l'encapsulation (Johansson & Soderhall 1989).

Chez les bivalves, plusieurs études ont été réalisées pour déterminer le rôle joué par les PO dans les défenses immunitaires de ces organismes en réponse à différents types d'agents pathogènes (**Tableau 18**). L'ensemble de ces résultats suggère que la présence de parasites ou d'algues toxiques entraînerait une diminution de l'activité PO (**Tableau 18**).

Récemment, chez *C. gigas*, une hybridation soustractive suppressive (SSH) a été réalisée entre des huîtres infectées par Ostreid Herpesvirus type 1 (OsHV-1) et des huîtres non

infectées (**Tableau 18** ; Faury & Renault, pers. comm.). Les résultats ont révélé une surexpression du gène codant pour la laccase. D'autres agents pathogènes tels que les espèces bactériennes, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* (Waechter *et al.* 2002, Gay *et al.* 2004, Garnier *et al.* 2007) ont également été fréquemment associées aux épisodes de mortalité estivale chez *C. gigas*. Cependant, aucune étude à notre connaissance n'a été réalisée quant à l'effet de ces infections 1) sur l'expression du gène codant pour la laccase chez *C. gigas* ou bien 2) sur le mode d'action des PO dans les mécanismes de défense immunitaire de *C. gigas* infectés par ces agents pathogènes.

2. L'infection par les *Vibrio* chez *C. gigas* associée aux évènements de mortalités estivales

Les *Vibrio* sont à l'origine de la plupart des pathologies bactériennes touchant tous les types de filières de production aquacole. Ce genre bactérien apparaît aussi comme le plus impliqué dans les épisodes de mortalités dues à des infections bactériennes chez les mollusques. Par exemple, chez les larves de plusieurs espèces de bivalves, *V. tubiashii* est l'agent pathogène responsable de la maladie nommée nécrose bacillaire (en anglais, bacillary necrosis ; Hada *et al.* 1984). La réémergence de *V. tubiashii*, causant de sévères épisodes de vibrioses, a récemment été rapportée dans des écloséries d'Amérique du Nord (Elston *et al.* 2008). Une autre espèce de *Vibrio*, *V. tapetis*, est responsable de la maladie de l'anneau brun chez les adultes de la palourde *T. philippinarum*, induisant des mortalités massives depuis quelques années en Europe (Borrego *et al.* 1996, Paillard *et al.* 2006).

Chez *C. gigas*, une souche de *V. splendidus* biovar II a été associée à des mortalités chez les larves (Sugumar *et al.* 1998). Puis, comme évoqué précédemment, les deux espèces bactériennes, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* (Waechter *et al.* 2002, Gay *et al.* 2004, Garnier *et al.* 2007) ont été fréquemment associées aux épisodes de mortalités estivales de l'huitre creuse. La plupart des souches de ces deux espèces isolées dans des contextes de mortalité présentent une pathogénicité en infection expérimentale, et, un effet synergique de la pathogénicité des souches *V. splendidus* LGP32 et *V. aestuarianus* 02/041 a pu être observé lorsqu'elles sont injectées en co-infection expérimentale (De Decker *et al.* In Press).

De plus, de récentes expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré que ces deux souches bactériennes provoquent une sous-expression précoce de plusieurs gènes impliqués dans les mécanismes de défense chez *C. gigas* (De Decker 2010). Cependant, aucune étude n'a été réalisée à notre connaissance sur l'activation des PO par la présence de ces bactéries et/ou de l'effet des PO sur la croissance de ces agents pathogènes.

Tableau 18 Etudes sur la modulation de l'activité PO en relation avec des expériences d'exposition à des agents pathogènes ou toxiques. NI : non indiqué ; ↓ : diminution ; ↑ : augmentation.

Organisme	Paramètre	Expérience	Approche	Temps	Compartiment	Résultats	Référence
Huître creuse d'Australie <i>Saccostrea glomerata</i>	Infection par le protozoaire parasite <i>Marteilia syneyi</i>	Comparaisons entre des huîtres provenant d'une zone non touchée et d'une zone touchée par la maladie QX	<i>In vivo</i>	NI	HL	Corrélation négative significative entre l'activité PO et l'infection : ↓ de l'activité PO avec ↑ de l'infection	Peters & Raftos 2003
Huître creuse américaine <i>Crassostrea virginica</i> et moule côtelée <i>Geukensia demissa</i>	Infection par le protozoaire parasite <i>Perkinsus marinus</i>	Echantillons d'hémolymphe placés dans un tube à essai avec des cellules de <i>Perkinsus marinus</i>	<i>In vitro</i>	6 h	Membrane des Hc	A 2h : ↑ de l'activité PO chez les deux espèces A 6h : réaugmentation de l'activité PO chez les deux espèces L'inhibition transitoire de l'activité PO chez l'hôte semblerait jouer un rôle dans l'infection de <i>Perkinsus marinus</i>	Jordan & Deaton 2005
Palourde commune <i>Venerupis decussata</i>	Infection par le protozoaire parasite <i>Perkinsus atlanticus</i>	Comparaison entre palourdes de sites avec différents niveaux d'infestation	<i>In vivo</i>	NI	Hc	↑ x5 de l'activité PO lors d'une infestation moyenne	Muñoz <i>et al.</i> 2006
					Hc	↑ x5 de l'activité PO lors d'une infestation faible	
Huître creuse du Pacifique <i>Crassostrea gigas</i>	Exposition au dinoflagellé <i>Alexandrium minutum</i>	Exposition à <i>Alexandrium minutum</i> (<i>Isochrysis sp.</i> ou clone Tahitien T Iso a été utilisé comme contrôle non toxique)	<i>In vivo</i>	4 jours	Hc	↓ 75 et 50% de l'activité PO chez les huîtres diploïdes et triploïdes exposées à <i>A. minutum</i> en comparaison au contrôle, au stade précoce de la maturation (Avril), respectivement. ↓ 30% et ↑ x 1,5 de l'activité PO chez les huîtres diploïdes et triploïdes exposées à <i>A. minutum</i> en comparaison au contrôle, au stade avancé de la maturation (Avril), respectivement.	Haberkorn <i>et al.</i> 2010
Huître creuse du Pacifique <i>Crassostrea gigas</i>	Infection par l' <i>Ostrea herpes</i> virus (OshV-1)	Hybridation soustractive suppressive (SSH) suite à l'infection d'huîtres par ce virus	<i>In vivo</i>	NI	Hc	Surexpression du gène codant pour la laccase	Faury & Renault, pers. comm.

DEMARCHE SCIENTIFIQUE ET PRINCIPAUX RESULTATS

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi de réaliser des incubations *in vitro* de différents tissus et compartiments hémolymphatiques de *C. gigas* avec deux souches de *Vibrio*, dans le but d'étudier l'implication des PO dans les mécanismes de défense de *C. gigas*. Les souches *V. splendidus* LGP 32 et *V. aesturianus* 02/041 ont été choisies pour leur caractère pathogène pour *C. gigas* et parce qu'elles ont été associées aux épisodes de mortalités estivales (Waechter *et al.* 2002, Gay *et al.* 2004, Garnier *et al.* 2007).

Une incubation a d'abord été réalisée en présence de 100µl de tissus (branchies, manteau, glande digestive), ou des compartiments hémolymphatiques (plasma et HLS) de *C. gigas* et 5 µl de *V. splendidus* LGP 32 (dont la DO à 620nm a été mesurée au préalable, est égale à 1, et correspond à une concentration de $1-2 \cdot 10^9$ unités formant colonies par ml), mais en absence de substrat des PO. Nous n'avons pas observé d'effet inhibiteur sur la croissance bactérienne par les différents tissus et compartiments hémolymphatiques. Ensuite, les expériences réalisées en présence de 100 µl d'un substrat commun à toutes les PO (la L-DOPA) ont montré une **inhibition de la croissance** de *V. splendidus* LGP 32 lorsque celle-ci était incubée avec des fractions brutes de HLS de *C. gigas*. Toutefois, nous n'avons observé aucune inhibition de la croissance bactérienne avec le plasma ou les autres tissus dans les mêmes conditions expérimentales (**Annexe 4**). Nos résultats suggèrent une implication de l'activité PO présente dans le HLS de *C. gigas* dans l'inhibition de la croissance de *V. splendidus*.

Les études ultérieures ont donc été poursuivies uniquement sur le HLS. Des résultats identiques à ceux obtenus avec *V. splendidus* LGP 32 ont également été observés avec une autre souche pathogène de l'huître, *V. aesturianus* 02/041, en présence de L-DOPA. L'inhibition de la croissance des deux souches bactériennes a été plus importante, en présence du substrat des laccases, la PPD (**Annexe 4**), suggérant que les PO et plus particulièrement les laccases joueraient un rôle dans l'inhibition de la croissance de ces deux souches pathogènes. Les résultats étant plus marquants chez *V. splendidus* LGP 32, nous avons choisi de continuer nos expériences avec cette souche. En utilisant le substrat

commun aux PO (la L-DOPA), ou le substrat des laccases (la PPD) puis, l'inhibiteur commun à toutes les PO (la PTU), l'activité antibactérienne du HLS sur *V. splendidus* LGP 32 a été totalement inhibée (**Annexe 4**).

Nous avons réalisé, par la suite, des expériences avec des fractions partiellement purifiées de HLS. En présence de ces fractions et de *V. splendidus* LGP32, l'inhibition de la croissance du *Vibrio* est plus importante en présence de PPD qu'en présence de L-DOPA. Avec l'inhibiteur des PO, la PTU, l'activité antibactérienne du HLS est inhibée en présence de PPD mais pas de L-DOPA, suggérant une implication de l'activité laccase dans l'inhibition de la croissance bactérienne (**Figure 31, 32 et 33; Annexe 4**). L'absence d'effet en présence de L-DOPA pourrait être expliquée par une perte d'activité PO de type catécholase observée lors du processus de purification (**Annexe 4**).

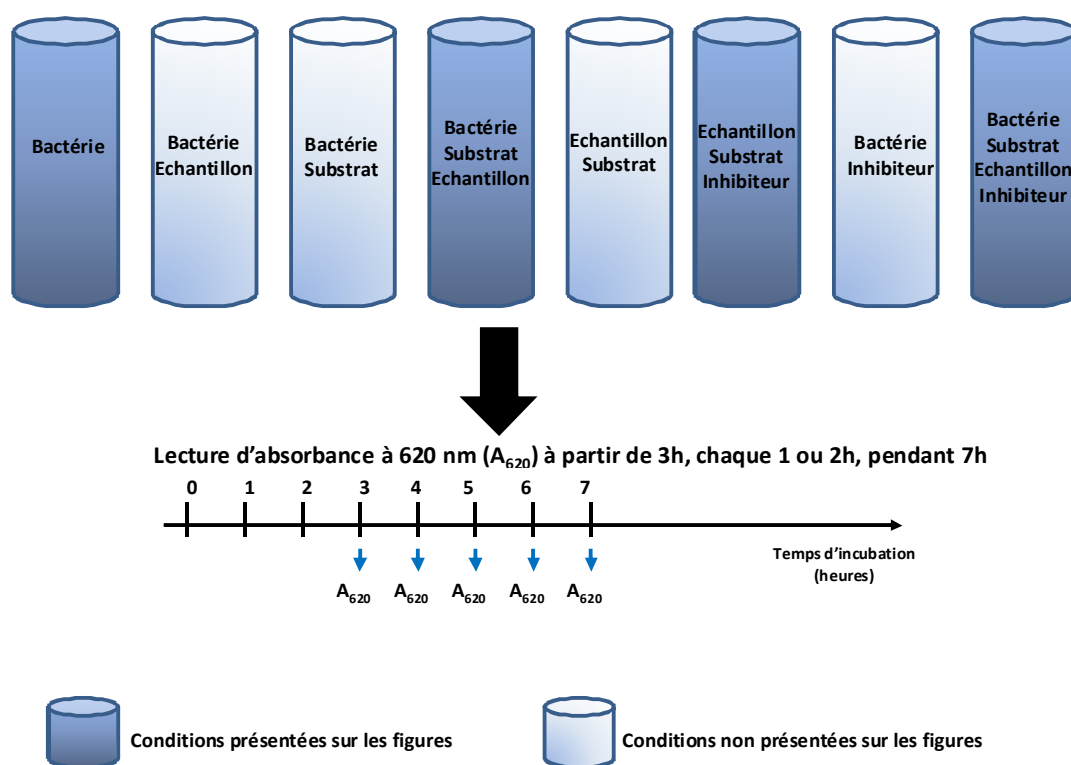


Figure 31 Protocole utilisé pour étudier l'effet des activités PO sur la croissance des *Vibrio*

Ainsi, les résultats obtenus lors de l'étude *in vitro*, réalisée avec différents tissus et compartiments hémolymphatiques de *C. gigas* et avec les deux agents pathogènes *V. splendidus* LGP 32 et *V. aesturianus* 02/041 (souvent associés aux mortalités estivales

chez *C. gigas*) suggèrent que l'activité PO, et plus particulièrement l'activité laccase, présente dans les hémocytes, a un rôle antibactérien contre ces deux agents pathogènes (**Annexe 4**). L'ensemble des résultats ont été résumé dans le **Tableau 19**.

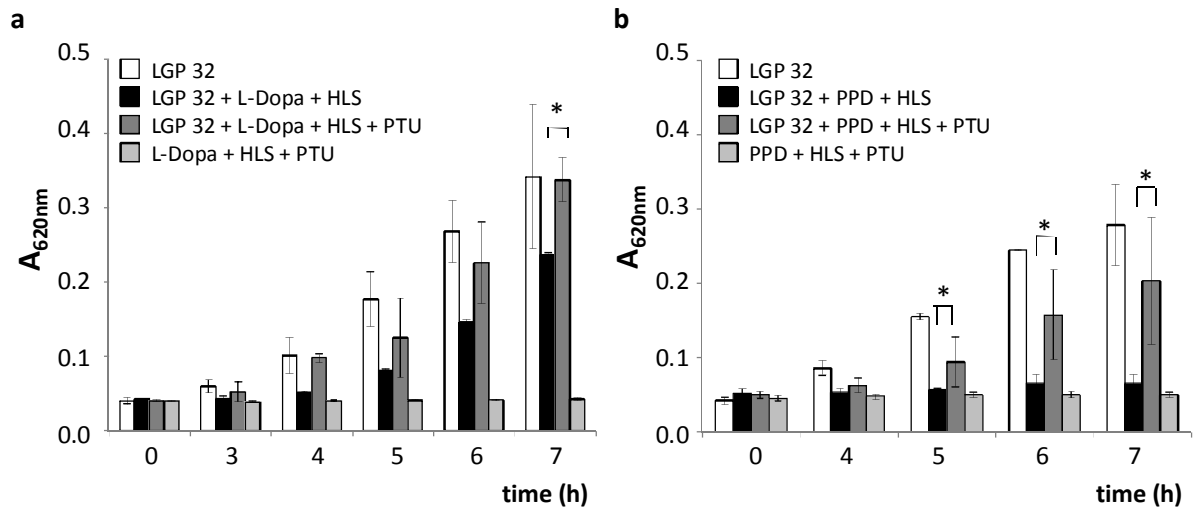


Figure 32 extraite de l'Annexe 4 Effet du HLS brut et de l'inhibiteur spécifique des PO, la PTU (1 mM), sur la croissance de *V. splendidus* LGP32, avec 1,25 mM de L-DOPA (a) ou avec 1,50 mM de PPD (b) comme substrats. Les mesures d'absorbance ont été réalisées à partir de culture à différents intervalles de temps. Moyenne \pm ES, n=9, *= différence significative pour $p < 0,05$ entre 'LGP 32+substrat+HLS' et 'LGP 32+substrat+HLS+PTU'.

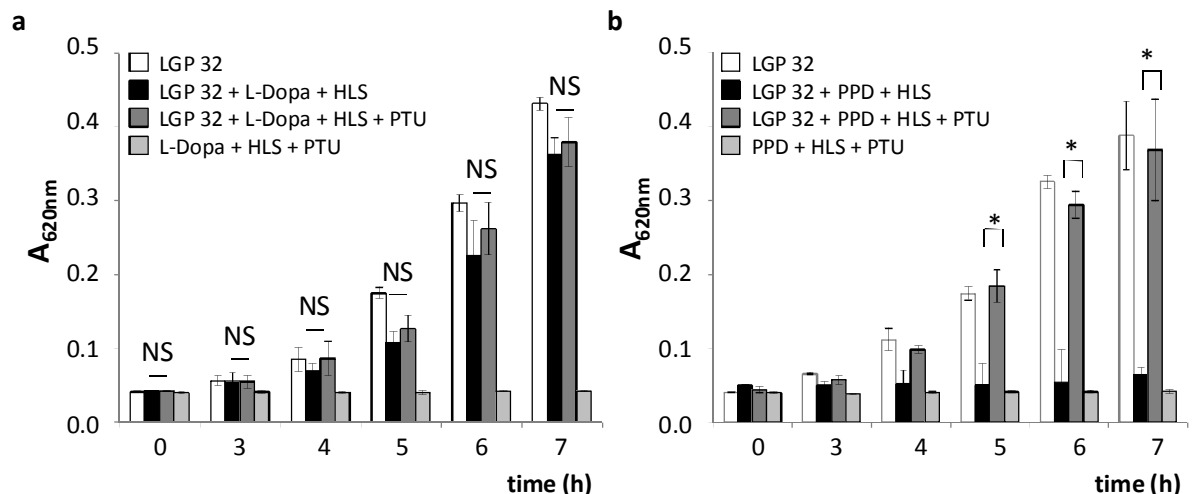


Figure 33 extraite de l'Annexe 4 Effet des fractions protéiques partiellement purifiées de HLS et de l'inhibiteur spécifique des PO, la PTU (1 mM), sur la croissance de *V. splendidus* LGP32, avec 1,25 mM de L-DOPA (a) ou 1,50 mM de PPD (b) comme substrats. Moyenne \pm ES, n=9, *= différence significative pour $p < 0,05$ entre 'LGP 32+substrat+HLS' et 'LGP 32+substrat+HLS+PTU'.

Tableau 19 Implication des PO de *Crassostrea gigas* dans l'inhibition de la croissance de souches bactériennes pathogènes, *Vibrio splendidus* LGP32 et *V. aesturianus* 02/041. HLS : surnageant de lysat hémostytaire ; « - » : non testé; L-DOPA: 3,4-L-dihydroxyphénylalanine; PPD: p-phénylènediamine; PTU: 1-phényl-2-thiourée.

Tissu ou compartiment hémolympatique	Effet sur <i>V. splendidus</i> LGP32					Effet sur <i>V. aesturianus</i> 02/041				
	En absence de substrat	Avec L-DOPA ¹ (1,25 mM)		Avec PPD ² (1,50 mM)		En absence de substrat	Avec L-DOPA ¹ (1,25 mM)		Avec PPD ² (1,50 mM)	
		Sans PTU ³ (1 mM)	Avec PTU ³ (1 mM)	Sans PTU ³ (1 mM)	Avec PTU ³ (1 mM)		Sans PTU ³ (1 mM)	Avec PTU ³ (1 mM)	Sans PTU ³ (1 mM)	Avec PTU ³ (1 mM)
Branchies	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-
Glande digestive	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-
Manteau	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-
Plasma	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-
HLS / HLS partiellement purifié	X / X	√ / √	X / √	√ / √	√ / √	-	√ / -	-	√ / -	-

√ Effet inhibiteur sur la croissance bactérienne

X Pas d'effet inhibiteur sur la croissance bactérienne

¹ Substrat commun à toutes les PO

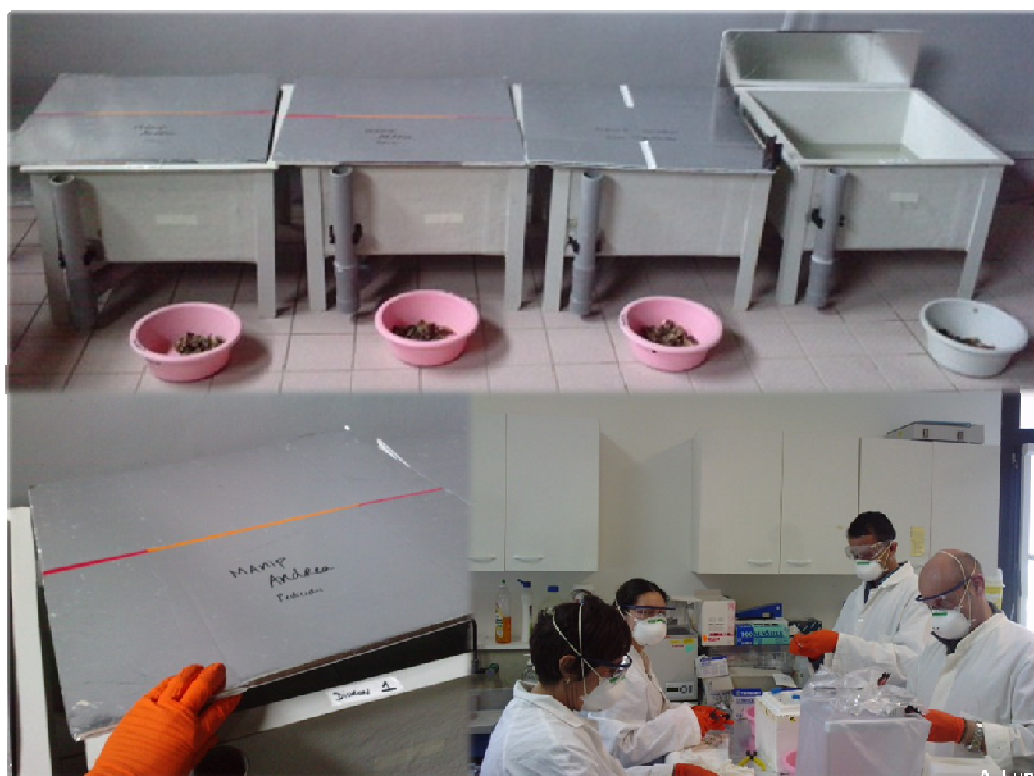
² Substrat des laccases

³ Inhibiteur commun à toutes les PO

CHAPITRE 2 : Potentiel des phénoloxydases comme biomarqueurs de l'exposition à des contaminants organiques : Expérimentations *in vivo*

Le deuxième chapitre de cette thèse porte sur la modulation des activités PO chez *C. gigas* dans différentes conditions d'exposition à des contaminants organiques *in vivo*. Pour cette étude, nous nous sommes placés dans des contextes de contamination déterminés au préalable chez cette espèce, à savoir 1) une exposition à un herbicide seul ou en mélange (Gagnaire 2005) et 2) une exposition à des hydrocarbures (Bado-Nilles 2008). Ainsi, ce chapitre est divisé en deux parties. Dans chaque partie sont présentés le contexte scientifique de l'étude, puis la démarche scientifique entreprise et les principaux résultats obtenus. La première partie traite des expériences réalisées pour évaluer l'effet d'un herbicide, le diuron, sur les activités PO de *C. gigas*. Le diuron a été testé de façon individuelle, ou en mélange avec un autre herbicide, l'isoproturon, et une molécule pharmaceutique, l'ibuprofène. La deuxième partie traite des expériences réalisées pour évaluer l'effet des hydrocarbures sur les activités PO de *C. gigas*, *via* deux voies d'exposition : l'eau et le sédiment.

Partie 1 : Modulation des phénoloxydases suite à l'exposition à un herbicide seul ou en mélange



CONTEXTE SCIENTIFIQUE

1. Comportement de l'activité phénoloxydase en présence de contaminants chimiques

1.1. Modulation de l'activité constitutive par les contaminants chimiques

Les mécanismes de défense peuvent être utilisés pour détecter des dysfonctionnements biologiques induits par une contamination chimique, traduisant des effets délétères potentiels (e.g., Cajaraville *et al.* 2000, Orbea *et al.* 2002, Boutet *et al.* 2003).

La présence d'activité PO a pu être mesurée chez des bivalves, tels que la moule bleue *M. edulis* dans des sites de bonne qualité environnementale (Dyrynda *et al.* 1998). Ce résultat suggère que l'activité PO peut exister sous une forme constitutive. Dans l'étude de Dyrynda *et al.* (1998), les organismes provenant des sites les plus contaminés avaient des niveaux d'activité PO plus élevés que ceux provenant de sites non contaminés. Le niveau d'activité constitutive de type PO semblerait varier alors en réponse à la qualité environnementale du site. Dans ce contexte, l'augmentation de l'activité PO correspondrait à un besoin de l'organisme d'accroître ses capacités de défense en réponse à un environnement agressif et, dans ce sens, reflèterait le degré de contamination des sites étudiés. En accord avec cette hypothèse, une corrélation entre l'activité PO et le niveau de contamination organique a été observé chez la moule bleue, *M. edulis* (Dyrynda *et al.* 1998).

Cependant, les expériences d'exposition à des contaminants conduites en conditions contrôlées au laboratoire chez les bivalves (**Tableaux 20 et 21**) et chez d'autres organismes aquatiques ou terrestres (**Tableau 22**), révèlent que la réponse de l'activité PO peut varier en fonction du contaminant, du temps d'exposition, du tissu et de l'organisme étudié. Parmi les données que nous avons pu collecter chez les bivalves

(**Tableaux 20 et 21**), des expositions à des contaminants inorganiques ou organiques, pour des durées allant de 1 à 66 jours peuvent conduire à une augmentation jusqu'à 10 fois, ou bien à une inhibition jusqu'à 100%, de l'activité PO par rapport aux organismes témoins.

Les exemples présentés dans les **Tableaux 20 et 21** mettent en évidence la difficulté à comparer l'ensemble de données existant dans la littérature, d'abord, parce que les résultats ont été obtenus par des méthodes variées, et ensuite, parce que les résultats obtenus avec la même méthode varient en fonction des conditions d'exposition aux contaminants employées. Une standardisation des méthodes utilisées semble donc essentielle pour étudier l'effet des contaminants sur l'activité PO et le potentiel de cette dernière à être utilisée comme biomarqueur de l'exposition à des contaminants.

L'ensemble des résultats présentés au cours de cette thèse ont été réalisés en utilisant toujours le même protocole de dosage des PO chez *C. gigas* et les expériences de contamination ont toujours été réalisées avec des huîtres, d'âge inférieur à 18 mois, ce qui nous a permis de réaliser une étude comparative de la modulation des activités PO dans différents contextes de contamination.

1.2. Modulation de l'activité stimulée et de l'activité induite par les contaminants chimiques

Le dosage de l'activité PO stimulée, consiste à préincuber l'échantillon avec un activateur des PO, avant de réaliser le dosage. De cette façon les PO sous forme proPO sont activées en forme PO.

L'effet de contaminants *in vivo* sur les activités constitutives de base (sans préincubation avec un activateur) et stimulée (avec préincubation avec un activateur) a été étudié sur différents organismes marins. Quelques exemples sont résumés dans le **Tableau 23**.

Tableau 20 Effet des métaux sur l'activité PO constitutive chez les bivalves. ↓, ↑, ns : diminution, augmentation ou pas de différence significative par rapport au contrôle, respectivement ; Cu : cuivre ; HgCl : chlorure de mercure ; Cd : cadmium ; Hg : mercure ; Pb : plomb ; HL : hémolymphe ; Hc : hémocytes ; P : plasma ; B : branchies ; GD : glande digestive ; M : manteau.

Organisme	Contaminant	Concentration	Approche	Temps (jours)	Méthode utilisée	Tissu	Résultats sur l'activité PO	Références
Moule bleue <i>Mytilus edulis</i>	Cu	0,02/0,05 mg.l ⁻¹	<i>In vivo</i>	7	Lames incubées avec la L-DOPA	HL (Hc)	ns	Pipe <i>et al.</i> 1999
Huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	Hg	2.10 ⁻⁶ /2.10 ⁻⁵ M	<i>In vitro</i>	1	L-DOPA, 490 nm, 21 h (tampon CAC)	HL (P)	↓ 95% / ↓ 95%	Gagnaire <i>et al.</i> 2004
	Cd	500 ng.l ⁻¹	<i>In vivo</i>	66			↑ x8 Rque: l'activité dans les organismes contrôle diminue dans le temps	Bouilly <i>et al.</i> 2006
Moule verte asiatique <i>Perna viridis</i>	Cu	20 µg.l ⁻¹	<i>In vivo</i>	25	L-DOPA, 5 min	HL (P)	Jour 5: ↓ 50% Jour 15: ↑ x8 Jour 25: ↑ x6	Thiagarajan <i>et al.</i> 2006
	Hg	10 µg.l ⁻¹	<i>In vivo</i>	25			Jour 5: ↓ 30% Jour 15: ↑ x 18 Jour 25: ↑ x10	
Huître perlière <i>Pinctada fucata</i>	Cu	0,05 µM	<i>In vivo</i>	3	L-DOPA (méthode de Pang <i>et al.</i> 2005)	B	A 12h: ns A 24h: ↓ 40% A 48h: ↑ x1,5 A 72h: ns	Jing <i>et al.</i> 2006
						GD	A 24h: ↑ x5 A 72h: ↓ 50%	
	Cu	0,5 µM	<i>In vivo</i>	3		B	A 72h : ↓ 40 to 60%	
	Pb	0,5 µM	<i>In vivo</i>	3		GD	A 72h : ↑ 10%	
						M	A 24h: ↓ 60% A 48h: ns A 72h: ↓ 60%	Jing <i>et al.</i> 2007
Moule d'eau douce <i>Lamellidens marginalis</i>	As	5 mg.l ⁻¹	<i>In vivo</i>	30	L-DOPA, 490 nm, 1 min. (tampon CAC)	B	A 48 et 72h: ↑ x2 A 96h: ↑ x4 A 30 jours: ↓ 50%	Chakraborty <i>et al.</i> 2010

Tableau 21 Effet des hydrocarbures et des biocides sur l'activité PO constitutive chez les bivalves. ↓, ↑, ns : diminution, augmentation ou pas de différence significative par rapport au contrôle, respectivement ; Flt : fluoranthène ; B(b)F : benzo(b)fluoranthène ; HFO : fuel lourd (en anglais, heavy fuel oil) ; LCO : pétrole léger (en anglais, light cycle oil) ; TBT : tri-butyl étain ; CuSO₄ : sulfate de cuivre ; HL : hémolymphe ; Hc : hémocytes ; P : plasma.

Organisme	Contaminant	Concentration	Approche	Temps (jours)	Méthode utilisée	Tissu	Résultats sur l'activité PO	Références
Hydrocarbures								
Moule bleue <i>Mytilus edulis</i>	Flt	200/400 µg.l ⁻¹	<i>In vivo</i>	7	Lames incubées avec L-DOPA	HL (Hc)	↑x2 / ↑ x4	Coles <i>et al.</i> 1994
Huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	B(b)F	10 ⁻⁷ /10 ⁻⁹ mg.l ⁻¹	<i>In vitro</i>	1	L-DOPA, 21h, 490 nm	HL (P)	↑40% / ↑ 34%	Bado-Nilles <i>et al.</i> 2008
	HFO	733 ± 111 ng.l ⁻¹	<i>In vivo</i>	9	L-DOPA, 21h, 490 nm	HL (P)	Jour 9 (de l'exposition) : ↓ 10% Jour 3 (de la dépuraction) : ↓ 20% Jour14 (de la dépuraction) : ↓ 20% Jour 30 (de la dépuraction) : ns	Bado-Nilles <i>et al.</i> 2008
	LCO	600 ± 315 ng.l ⁻¹	<i>In vivo</i>	7	L-DOPA, 21h, 490 nm	HL (P)	Jour 7 (de l'exposition) : ↓ 15% Jour 7 (de la dépuraction) : ↓ 15% Jour 14 (de la dépuraction) : ↓ 30%	Bado-Nilles <i>et al.</i> 2010
PCRq (expression relative de l'ARNm correspondant au gène codant pour la laccase)					HL (Hc)	Jour 7 (de l'exposition) : ↑ à 2		
Biocides								
Moule bleue <i>Mytilus edulis</i>	TBT	10 mg.l ⁻¹	<i>In vitro</i>	NI	PO purifiée, L-DOPA, 475 nm	Pied	↓ 76 à 100%	Hellio <i>et al.</i> 2001
	CuSO ₄	10 mg.l ⁻¹	<i>In vitro</i>	NI		Pied	↓ 76 à 100%	

Tableau 22 Effet des contaminants sur l'activité PO chez des organismes autres que les bivalves. ↓, ↑ : diminution ou augmentation par rapport au contrôle, respectivement ; ∅ : pas d'activation ; Ag : argent ; Cd : cadmium ; Cu : cuivre ; Hg : mercure ; Pb : plomb ; Zn : zinc ; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ; PCB : polychlorobiphényles ; Mn : manganèse ; BaP : benzo(a)pyrène ; HL : hémolymphe ; Hc : hémocytes ; P : plasma ; LPS : lipopolysaccharides.

Organisme		Tissu	Méthode	Activation	Approche	Exposition	Temps (jours)	Résultats	Références
Origine	Nom								
Terrestre	Pleurote en forme d'huître <i>Pleurotus ostreatus</i>	Culture cellulaire	ABTS (substrat des laccases)	∅	<i>In vivo</i>	Cu (0,5/ 5 mM) / Cd (1 / 2 mM)	21	↑ x 4,7 / x 8 / x3,7 / x18,5	Baldrian & Gabriel 2002
						Ag (1 mM) / Hg (1 mM) / Pb (1 mM) / Zn (1 mM) / H ₂ O ₂ (0,5 mM)	3	↓ de 24 à 99 %	
	Papillon noctuelle du chou <i>Mamestra brassicae</i>	HL	L-DOPA, 30 min 490 nm	∅	<i>In vivo</i>	Larves alimentés avec de la nourriture contaminée : Cu (7,6 / 76 µg.g ⁻¹ poids sec de nourriture) / Cd (8 µg.g ⁻¹) / Pb (8,9 µg.g ⁻¹) / F (7,2 µg.g ⁻¹)	NI	↓ de 22% à 78%	Kazimirova & Slovak 1996
	Papillon arpeuteuse verte veloutée <i>Epirrita autumnata</i>	HL	L-DOPA, 1 min	∅	<i>In vivo</i>	Larves nourries avec de la nourriture contaminée jusqu'au stade pupae	NI	↑	Van Ooik <i>et al.</i> 2007
Eau douce	Crevette géante bleue <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	HL (Hc)	L-DOPA, 5 min (tampon CAC)	∅	<i>In vivo</i>	Trichlorfon (0,2 / 0,3 mg.l ⁻¹)	8	↓ 25 / ↓ 26 %	Yeh <i>et al.</i> 2005
		HL (Hc)	L-DOPA, 5 min, 490 nm	Trypsine	<i>In vivo</i>	Trichlorfon (0,2 / 0,4 mg.l ⁻¹)	6	↓ 25% à partir du 2 ^{ème} jour	Chang <i>et al.</i> 2006
Marine	Crevette grise <i>Crangon crangon</i>	HL	L-DOPA, 10 min, 490 nm	Trypsine	<i>In vitro</i>	PBC 15 et PCB 77 (0,05 to 500 µg.l ⁻¹)	5	↓	Smith & Johnston 1992
		HL	L-DOPA, 10 min, 490 nm		<i>In vivo</i>	Déchets de dragage des ports	12	↓ x 2	Smith <i>et al.</i> 1995
	Ascidie plisée <i>Styela plicata</i>	HL (Hc)	L-DOPA, 20 min, 490 nm (tampon CAC)	Zymosan + trypsin	<i>In vitro</i>	TBT (1 / 5 µg.l ⁻¹)	2	↑ x 4,4	Tujula <i>et al.</i> 2001
				∅		Cu (1 / 25 mg.l ⁻¹)		↑ x 5	
	Langoustine <i>Nephrops norvegicus</i>	HL (Hc)	L-DOPA, 45 min, 492 nm	LPS	<i>In vivo</i>	Mn (20 mg.l ⁻¹)	10	↓ x 2	Hernroth <i>et al.</i> 2004
	Ormeau <i>Haliotis diversicolor</i>	HL (P)	L-DOPA, 5 min, 460 nm	LPS ou laminarine	<i>In vivo</i>	BaP (0,02 / 0,08 mg.l ⁻¹)	7	↑ x 3	Gopalakrishnan <i>et al.</i> 2009
∅				BaP (0,04 / 0,08 mg.l ⁻¹)		↑ x 2			
Seiche commune <i>Sepia officinalis</i>	Œufs	L-DOPA, 120 h, 490 nm (tampon CAC)	∅	<i>In vivo</i>	Ag (230 µg.l ⁻¹)	50	↓ x2 au jour 45 et ↑20% au jour 50	Lacoue-Labarthe <i>et al.</i> 2009	

D'autres auteurs se sont intéressés à l'induction de la synthèse des PO, c'est-à-dire au déclenchement de l'expression de gènes codant pour les PO. Certaines études ont été réalisées, par exemple, sur l'amplitude de l'induction chez des organismes exposés à une contamination *in vivo*, en comparaison à des animaux témoins non exposés (e.g., Bado-Nilles *et al.* 2010). Chez *C. gigas* par exemple, l'exposition des huîtres à de la fraction soluble de pétrole léger induit une augmentation de l'expression relative d'ARNm du gène codant pour la laccase dans les hémocytes, après sept jours d'exposition *in vivo* (Bado-Nilles *et al.* 2010). Puisque les laccases peuvent catalyser l'oxydation de composés aromatiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par un mécanisme indirect impliquant la participation d'un médiateur (Dodor *et al.* 2004), ces auteurs ont suggéré qu'une augmentation de la transcription du gène codant pour la laccase pourrait jouer un rôle de protection chez *C. gigas* contre les HAP bioaccumulés, et donc potentiellement toxiques (Bado-Nilles *et al.* 2010).

1.3. Saturation ou inhibition des phénoloxydases

L'exposition des animaux à différents composés ayant des caractéristiques similaires aux substrats des PO peut induire une saturation de cette enzyme. Cette saturation peut mener à une inhibition des mécanismes de défense impliquant les PO en présence d'agents pathogènes et donc favoriser l'infection par ces derniers. Cependant, aucune étude à notre connaissance n'a été réalisée pour le montrer clairement.

2. Les herbicides et les molécules pharmaceutiques

Les herbicides de type phénylurée peuvent avoir un effet sur différents constituants moléculaires, protéiques et cellulaires impliqués dans les mécanismes de défense chez *C. gigas* (Tanguy *et al.* 2005, Bouilly *et al.* 2007, Gagnaire *et al.* 2007). La majorité de ces effets ont été mis en évidence en exposant des organismes au stade adulte et sur des temps d'exposition relativement longs (une semaine à trente jours ; Tanguy *et al.* 2005, Bouilly *et al.* 2007, Gagnaire *et al.* 2007), ce qui permet d'avoir une idée de l'effet d'une contamination chronique.

Cependant, aucune étude n'a été réalisée à notre connaissance au stade de vie juvénile, connu comme étant plus sensible que le stade de vie adulte à différentes sources de stress telles que la présence de contaminants. De plus, certains auteurs ont suggéré que les traitements agricoles avec des herbicides, dans la période précédant les épisodes de mortalité estivale, pourraient être un des facteurs favorisant la fragilisation des huîtres (Munaron 2004). En effet, en période de crue, ces herbicides arrivent dans les zones côtières et estuariennes à des concentrations relativement élevées (aux alentours de $\sim 1 \mu\text{g.l}^{-1}$), mais souvent sur des durées de temps très courtes, inférieures à un jour (Munaron 2004, Hyne & Aistrope 2008). Ainsi, dans le but de se rapprocher le plus possible des conditions rencontrées dans le milieu naturel, il est donc important de tester les effets des contaminants à différentes concentrations mais aussi d'effectuer des tests sur de courtes durées.

En outre, dans des échantillons d'eau où les concentrations en herbicides ont été rapportées comme étant élevées, d'autres contaminants tels que la molécule pharmaceutique ibuprofène ont aussi été détectés (Munaron 2004, Muñoz *et al.* 2009). En effet, l'ibuprofène n'est éliminé par les stations d'épuration que de façon partielle et a été détectée dans les zones côtières et estuariennes à des concentrations allant jusqu'à $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Tixier *et al.* 2003). L'ibuprofène est une drogue anti-inflammatoire non stéroïdienne (en anglais, non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID) et des effets négatifs des NSAID sur les organismes aquatiques ont été rapportés à de faibles concentrations (du ng.l^{-1} au $\mu\text{g.l}^{-1}$; e.g., Pomati *et al.* 2004, De Lange *et al.* 2006). Cependant, leurs effets chez les bivalves marins ont été peu étudiés jusqu'à aujourd'hui (e.g., Gagné *et al.* 2006, Ericson *et al.* 2010).

Dans ce contexte général, nous avons voulu étudier l'effet d'un herbicide, présent seul ou en mélange à un autre herbicide et à une molécule pharmaceutique, sur différentes activités enzymatiques impliquées dans les mécanismes de défense de juvéniles de *C. gigas*, et notamment sur les activités PO.

Tableau 23 Exemples d'études sur l'effet des contaminants sur l'activité PO stimulée. ↓, ↑ : diminution, augmentation ou pas de différence significative de l'activation de la proPO par rapport au contrôle, respectivement PCB : polychlorobiphényles ; TBT : tri-butyl étain ; Mn : manganèse ; BaP : benzo(a)pyrène ; HL : hémolymphe ; Hc : hémocytes ; P : plasma ; LPS : lipopolysaccharides.

Méthode utilisée (spectrophotométrie)	Mode d'activation de la proPO	Organisme	Tissu	Approche	Exposition	Temps (jours)	Résultats en comparaison au contrôle	Références
L-DOPA, 10 min, 490 nm	Trypsine	Crevette grise <i>Crangon crangon</i>	HL	<i>In vitro</i>	PCB 15 et PCB 77 (0,05 à 500 µg.l ⁻¹)	5	↓	Smith & Johnston 1992
L-DOPA, 10 min, 490 nm	Trypsine		HL (Hc)	<i>In vivo</i>	Sédiments de dragage de port contaminés	12	↓ x 2	Smith <i>et al.</i> 1995
L-DOPA, 20 min, 490 nm (tampon CAC)	Zymosan + trypsine	Ascidie plissée <i>Styela plicata</i>	HL (Hc)	<i>In vitro</i>	TBT : 5 µg.l ⁻¹	2	↑ x 6	Tujula <i>et al.</i> 2001
					CuSO ₄ : 25 mg.l ⁻¹	2	↑ x 6	
L-DOPA, 45 min, 492 nm	LPS ou trypsine	Langoustine commune <i>Nephrops norvegicus</i>	HL (Hc)	<i>In vivo</i>	Mn : 20 mg.l ⁻¹	10	↓ x 2 quand prétraité avec LPS	Hernroth <i>et al.</i> 2004
L-DOPA, 5 min, 460 nm	Préincubation pendant 20 minutes avec PBS	Ormeau <i>Haliotis diversicolor</i>	HL (P)	<i>In vivo</i>	BaP : 0,04 et 0,08 mg.l ⁻¹	7	↑ x 3	Gopalakrishnan <i>et al.</i> 2009

DEMARCHE SCIENTIFIQUE ET PRINCIPAUX RESULTATS

Les éléments que nous avons voulu faire varier dans nos expériences sont :

- Le temps d'exposition ;
- La nature des contaminants ;
- La concentration des contaminants ;
- Les effets d'association des contaminants (un seul contaminant ou plusieurs).

Ainsi, nous avons étudié dans un premier temps l'activité PO de *C. gigas* dans des huîtres juvéniles exposées au diuron à 1 µg.l⁻¹ pendant 24h. De plus, certaines études ont montré que certains paramètres physico-chimiques, tels que la lumière, peuvent provoquer la dégradation de molécules contaminantes comme le diuron (Shankar *et al.* 2008). Dans le but d'étudier l'effet de la molécule mère, et non pas celui du (ou des) produit(s) de dégradation, nous avons choisi alors de réaliser nos expériences à l'obscurité (**Tableau 24**).

Tableau 24 Paramètres pris en considération et changés dans le cadre de cette thèse, en comparaison à des expériences d'exposition aux herbicides réalisées dans le passé chez *Crassostrea gigas*.

Paramètre	Expériences d'exposition aux herbicides sur <i>C. gigas</i> réalisées dans le passé*	Expériences réalisées dans le cadre de cette thèse	Raison
Stade de vie	Adulte	Juvéniles	Contexte des mortalités estivales affectant les juvéniles de façon plus importante que les adultes.
Durée d'exposition	De 1 semaine à 1 mois	≤ 24 h	Les pics de concentrations en herbicides dans les côtes et estuaires varient de façon importante dans une échelle de temps ≤ 24 h (Munaron 2004, Hyne & Aistrop 2008a).
Lumière	Oui	Non	Le diuron, par exemple, présente une demi-vie de 5 h en présence de lumière naturelle (Shankar <i>et al.</i> 2008a).

* e.g., Tanguy *et al.* 2005, Bouilly *et al.* 2007, Gagnaire *et al.* 2007

Nous avons réalisé une cinétique d'analyse en prélevant des huîtres à 0, 2, 6 et 24h d'exposition (**Figure 34**).

Nous avons également réalisé un suivi de l'expression de certains gènes impliqués dans les mécanismes de défense chez *C. gigas* (**Tableau 25**), tels que le gène codant pour la laccase, qui a été séquencé récemment chez *C. gigas*, puis les gènes « macrophage expressed protein 1-like » (MAC), impliqué dans les mécanismes de phagocytose, « myeloid differentiation factor 88 » (MYD 88), impliqué dans des mécanismes de signalisation cellulaire, superoxyde dismutase (SOD), impliqué dans les défenses antioxydantes, « lipopolysaccharide-binding protein / mammalian bactericidal / permeability-increasing protein » (LBP/BPI), impliqué dans la signalisation et l'activation de la cascade d'activation des PO, entre autres, « tissue inhibitor of metalloproteinases » (TIMP), impliqué dans l'inhibition de protéases d'agents pathogènes et le lysozyme, impliqué dans la dégradation des bactéries. L'activité enzymatique a été suivie au niveau du plasma puis l'expression des gènes au niveau des hémocytes.

Dans un second temps, nous avons étudié l'activité PO chez des huîtres juvéniles exposées à du diuron ($5 \mu\text{g.l}^{-1}$), de l'isoproturon ($5 \mu\text{g.l}^{-1}$) et de l'ibuprofène ($5 \mu\text{g.l}^{-1}$) pendant 6h. Nous avons réalisé une cinétique de l'activité enzymatique en prélevant des huîtres à 0, 1, 3 et 6h (**Figure 35**). Nous nous sommes intéressés principalement à étudier les effets de ces contaminants chimiques au niveau du plasma de *C. gigas*. Puis, nous avons étudié également deux paramètres hémocytaires : le pourcentage de mortalité et le pourcentage de phagocytose.

Nos résultats ont révélé que, suite à une exposition des huîtres au diuron à $1 \mu\text{g.l}^{-1}$, l'activité laccase est inhibée dans le plasma de *C. gigas*, en comparaison au contrôle, après 2 et 6h d'exposition (**Figure 36a**). En revanche, aucun effet n'a été observé au niveau de l'activité catécholase. Après 6 et 24h d'exposition l'activité SOD est inhibée dans le plasma de *C. gigas* (**Figure 36b**). A l'échelle moléculaire, après 2 et 24h, le gène codant pour la laccase est sous-exprimé alors qu'après 6h il est surexprimé dans les hémocytes de *C. gigas* (**Figure 37**). L'expression d'autres gènes impliqués dans les mécanismes de défense (**Tableau 25**) est aussi modulée en présence du diuron, notamment après 2h d'exposition (**Figure 37**).

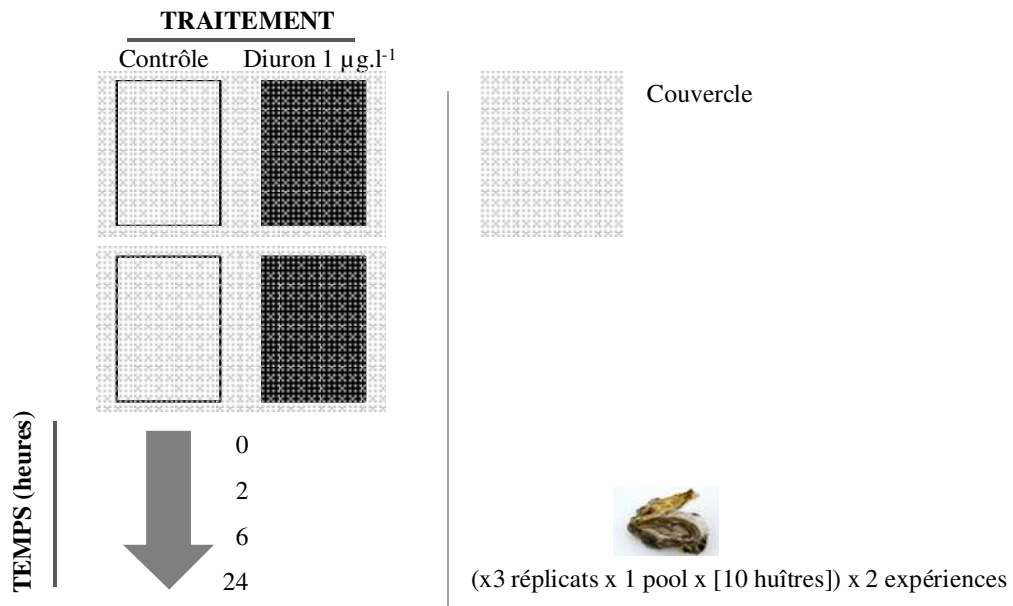


Figure 34 Protocole de l'expérience de contamination en présence de diuron à 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$

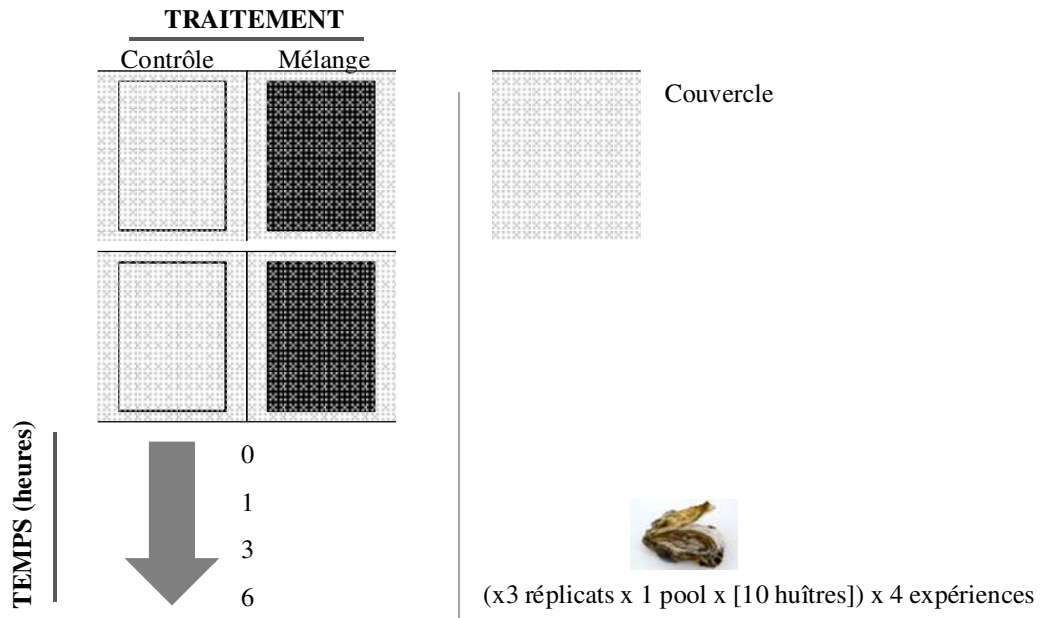


Figure 35 Protocole de l'expérience de contamination en présence d'un mélange de 5 $\mu\text{g diuron.l}^{-1}$, 5 $\mu\text{g d'isoproturon.l}^{-1}$ et 5 $\mu\text{g d'ibuprofène.l}^{-1}$.

Tableau 25 extrait de l'Annexe 5 Gènes impliqués dans les mécanismes de défense, référence des gènes choisis pour l'analyse en PCRq et séquences sélectionnées pour les amorces. MAC: macrophage expressed protein 1-like; MyD88: myeloid differentiation factor 88; SOD: superoxide dismutase; LBP/BPI: lipopolysaccharide-binding protein (LBP)/mammalian bactericidal/permeability-increasing protein; TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinases; EF I: elongation factor I.

Gènes	Fonctions	Séquence des amorces 5'-3'		GenBank n°	Référence
Laccase	Défenses humorales	Forward	tgg ttc ctg cat tgt cac at	EU678320	Faury <i>et al.</i> , pers. com.
		Reverse	aag agt atc agc cgc gaa aa		
MAC	Phagocytose	Forward	acc gag acc gag ttt cag ggg gta g	EF627979	Bado-Nilles <i>et al.</i> 2010
		Reverse	gcc acc gaa agc cgg aga aga tgt c		
MyD88	Signalisation cellulaire	Forward	cgt gcc atg gac gga taa caa cg	DQ530619	Bado-Nilles <i>et al.</i> 2010
		Reverse	ggc cca gca gta cct ctg tgg aat c		
SOD	Défenses antioxydantes	Forward	atc tga ccg gtt tca acg tc	BQ426796	Faury <i>et al.</i> , pers. com.
		Reverse	gcc aat cga aag tcc tgg ta		
LBP/BPI	Signalisation cellulaire et activation des PO	Forward	tga cgt cag ccc aat gta ag	AY165040	De Decker <i>et al.</i> , pers. com.
		Reverse	act gct ggg ctt tgt gaa ct		
TIMP	Inhibition des protéases	Forward	agt cat tga atc cgg acc ag	BQ427105	Faury <i>et al.</i> , pers. com.
		Reverse	aac ccc tcc ttc cct ctg ta		
Lysozyme	Enzyme bactéricide	Forward	gcg gct act tcc aaa tca ag	AB179775	Faury <i>et al.</i> , pers. com.
		Reverse	tca cag ttt gct gga caa cc		
EF I	Elongation traductionnelle (Gène de référence)	Forward	agt cac caa ggc ggc tgc aca gaa	BQ426516	Montagnani <i>et al.</i> 2007
		Reverse	tcc gac gta ttt ctt tgc gat gt		

Suite à une exposition des huîtres à un mélange de $5 \mu\text{g}$ de diuron. l^{-1} , $5 \mu\text{g}$ d'isoproturon. l^{-1} et $5 \mu\text{g}$ d'ibuprofène. l^{-1} , l'activité catécholase plasmatique est inhibée après 6h d'exposition, en comparaison au contrôle (**Figure 38**). Malheureusement, la quantité d'échantillon, insuffisante, ne nous a pas permis de mesurer l'activité laccase lors de cette expérience. A l'échelle cellulaire, aucun effet n'a été observé au niveau du pourcentage de mortalité mais le pourcentage de phagocytose cellulaire a diminué après 6h d'exposition, en comparaison au contrôle (**Figure 38**).

L'ensemble de ces résultats suggère que les contaminants peuvent exercer un effet sur les activités PO dans l'hémolymphe de *C. gigas* en peu de temps, qu'ils soient testés de façon indépendante ou en mélanges, et que l'induction ou la répression de gènes codant pour des PO peut avoir lieu de façon **précoce**, c'est-à-dire en moins de 24h. L'intérêt de ces résultats porte principalement sur le fait que pour ces expériences 1) nous avons utilisé des concentrations relativement proches des **concentrations que l'on peut trouver dans les milieux** côtiers et estuariens et surtout 2) que l'on s'est intéressé à étudier leurs effets sur des **échelles de temps relativement courtes** 3) et au stade de vie **juvénile**.

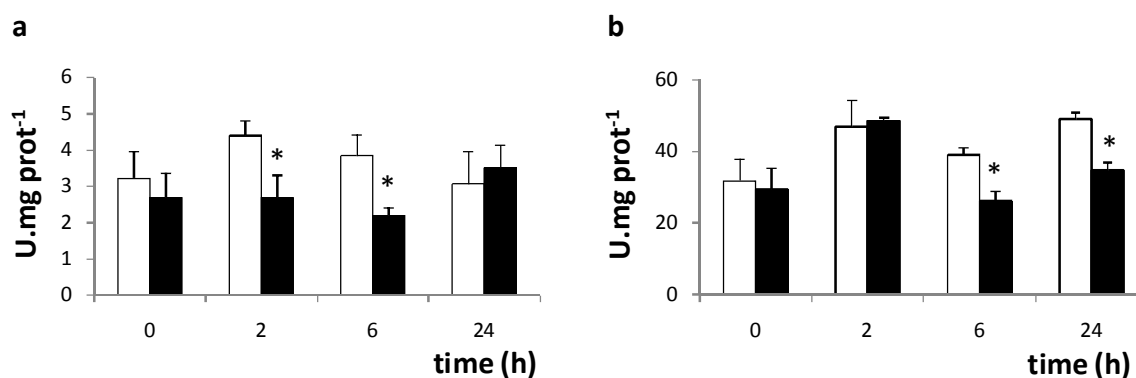


Figure 36 extraite de l'Annexe 5 Effet du diuron ($1 \mu\text{g}.\text{l}^{-1}$) sur l'activité enzymatique de *Crassostrea gigas*. a. Activité laccase b. Activité superoxyde dismutase (SOD). Moyenne \pm ET U mg.prot⁻¹, n= 6 (3 réplicas de 2 pools de 20 huîtres), N= 2 réplicas d'expérience * Différence significative entre le contrôle et le traitement à chaque temps avec $p < 0,05$.

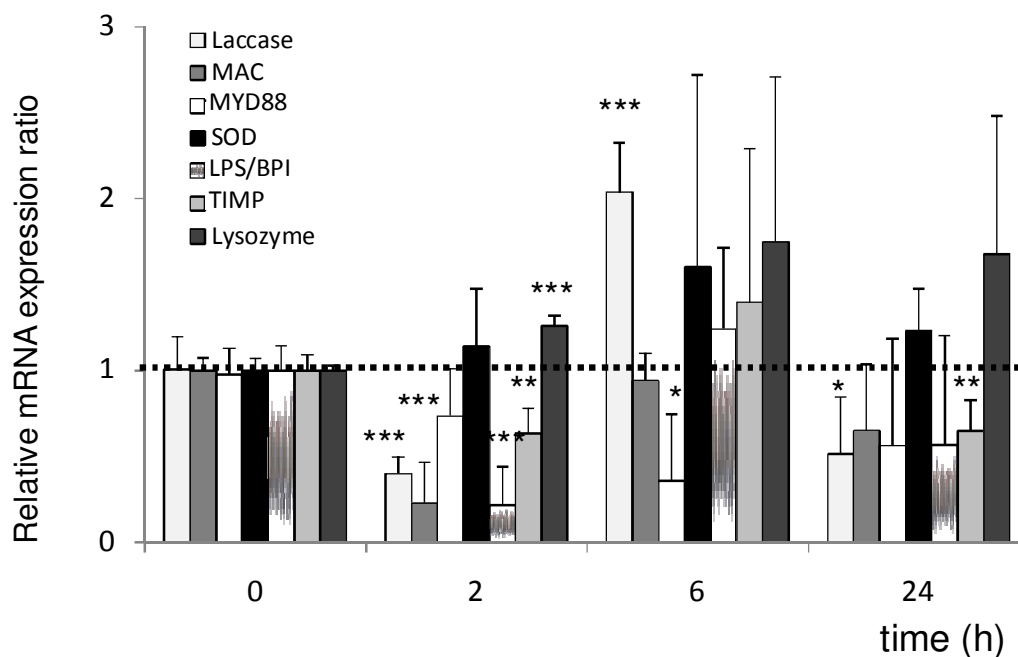


Figure 37 extraite de l'Annexe 5 Effet du diuron ($1 \mu\text{g.l}^{-1}$) sur l'expression de gènes chez *Crassostrea gigas*. Les résultats sont exprimés comme le ratio entre l'expression relative par rapport au contrôle à chaque temps. Les valeurs du contrôle sont représentées par une ligne en pointillée située au ratio de l'expression relative des transcrits de 1. Moyenne \pm ET ratio de l'expression relative de l'ARNm, $n=6$ (3 réplicas de 2 pools de 20 huîtres), $N=2$ réplicas d'expérience. Différence significative entre le contrôle et le traitement à chaque temps avec * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

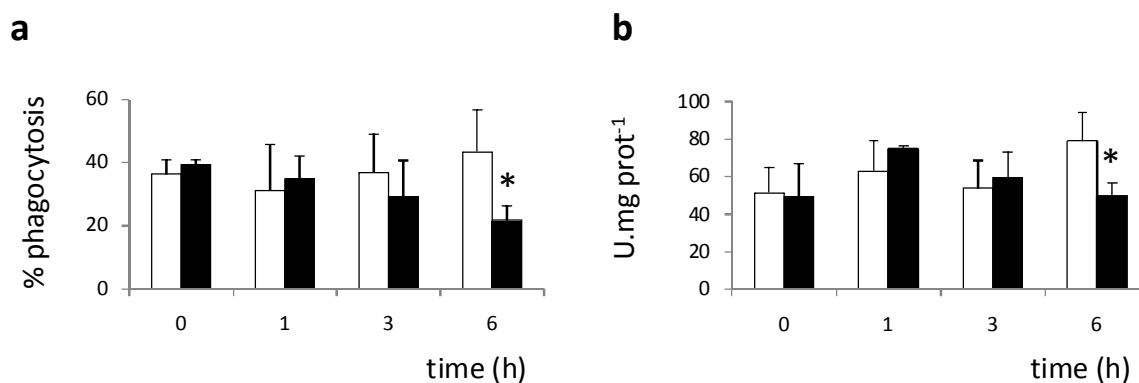


Figure 38 extraite de l'Annexe 5 Effet d'un mélange d'herbicides (diuron à $5 \mu\text{g.l}^{-1}$, isotroturon à $5 \mu\text{g.l}^{-1}$) et d'une molécule pharmaceutique (ibuprofène à $5 \mu\text{g.l}^{-1}$) sur (a) la phagocytose cellulaire (en %) et (b) l'activité catécholase plasmatique (en U.mg prot^{-1}). Les barres blanches correspondent à la condition contrôle et les barres noires correspondent à la condition traitement. Moyenne \pm ET % ou U mg.prot^{-1} , $n=12$ (4 réplicas de 3 pools de 20 huîtres), $N=4$ réplicas d'expérience * Différence statistique significative entre la condition contrôle et la condition traitement par temps avec $p<0,05$.

Ce type d'expériences permet alors de se rapprocher de ce qui se passe dans le milieu naturel lorsque des pics de pollution ont lieu, par exemple, lors des phénomènes de crues.

Parmi d'autres contaminants susceptibles de moduler les activités PO, des études ont montré récemment que les hydrocarbures pouvaient moduler l'activité de type PO chez *C. gigas* (Bado-Nilles *et al.* 2009). Ainsi, la deuxième partie de ce chapitre traite des expériences réalisées pour évaluer l'effet des hydrocarbures sur les activités PO de *C. gigas*.

Partie 2 : Modulation des activités phénoloxydase lors d'une exposition à des hydrocarbures via l'eau ou le sédiment



CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Les catastrophes pétrolières, telles que Torrey Canyon (1967, UK; 119 000 t), Amoco-Cadiz (1978, France; 227 000 t), Exxon-Valdez (1989, USA; 38 800 t), Sea Empress (1996, UK, 147 000 t), Erika (1999, France; 31 000 t) ou Prestige (2002, Espagne; 77 000 t), sont bien connues pour les dégâts économiques et écologiques qu'elles provoquent.

Parmi les solutions proposées pour limiter ce type de catastrophes, les dispersants chimiques³³ sont considérés comme un moyen efficace de lutte antipollution. Ces tensioactifs favorisent la solubilisation de la nappe d'hydrocarbures dans l'eau (Canevari 1973, 1978, Li & Garrett 1998). Cependant, lorsque le dispersant est utilisé près des côtes ou des estuaires, cette solubilisation augmente la biodisponibilité des hydrocarbures pour des organismes filtreurs tels que *C. gigas*. L'activité de type PO dans le plasma, ainsi que l'expression du gène codant pour la laccase au niveau des hémocytes peuvent être modulées chez *C. gigas* en présence d'hydrocarbures (Bado-Nilles *et al.* 2009, Bado-Nilles *et al.* 2010). Ainsi, nous avons étudié les effets des hydrocarbures dispersés chimiquement ou non sur les activités PO chez *C. gigas*. Dans les études précédentes concernant la modulation de l'activité PO chez *C. gigas* par les hydrocarbures (Bado-Nilles 2008), les contaminations ont été réalisées par voie aqueuse. Or, à la différence des molécules relativement hydrophiles telles que le diuron, qui restent dans la phase dissoute, les molécules de nature lipophile, telles que les hydrocarbures, vont avoir tendance à se fixer au niveau des particules (Byrne & O'Halloran 2001). La phase particulaire joue donc un rôle important dans les processus de bioaccumulation des contaminants lipophiles (Baumard *et al.* 1998). Ainsi, nous avons voulu dans cette étape étudier l'effet des hydrocarbures sur les activités PO chez *C. gigas* en comparant deux voies d'exposition, *via* l'eau et *via* le sédiment.

³³ Dispersant chimique: tensioactif ou agent de surface. Ces molécules amphiphiles modifient la tension superficielle existant entre l'eau et l'hydrocarbure, permettant alors de fixer les molécules hydrophobes (hydrocarbures) pour les mélanger avec des molécules hydrophiles (eau) et donc, faciliter la solubilisation des hydrocarbures dans la colonne d'eau.

DEMARCHE SCIENTIFIQUE ET PRINCIPAUX RESULTATS

Les éléments que nous avons voulu faire varier dans nos expériences sont :

- Le temps d'exposition ;
- La concentration des contaminants ;
- La disponibilité du contaminant (en présence d'un dispersant chimique ou non).

Dans un premier temps, nous avons étudié les modulations de l'activité PO chez des huîtres juvéniles exposées à 20g de pétrole léger Arabian light étété³⁴ à 110°C (BAL 110). Nous avons choisi ce pétrole parce qu'il a une composition chimique proche de celle d'hydrocarbures qui ont été déversés dans le milieu suite à des catastrophes pétrolières comme celles de l'Amoco-Cadiz. Généralement, une fois l'hydrocarbure est déversé dans la mer, il peut être amené par le mouvement des vagues, de la houle et des vents près des côtes. Arrivé aux côtes, plusieurs composés volatiles auront disparu de la composition initiale. Dans le cadre de nos expériences, l'hydrocarbure a alors été étété à 110°C, de façon à éliminer les composés les plus volatiles et simuler ainsi la composition d'un hydrocarbure qui serait déversé en mer et qui arriverait avec une composition légèrement différente auprès des côtes. L'exposition a été réalisée dans des bacs de 300 l, en présence (condition CD pour dispersion chimique) ou en absence de 1,2 g de dispersant chimique (condition MD pour dispersion mécanique), sur une durée de 2 jours. Cette période d'exposition a été suivie d'une période de déuration en eau de mer non contaminée de 15 jours. Différents contrôles ont été réalisés également, la condition WSF correspondant à la fraction soluble de l'hydrocarbure (contrôle interne de la dispersion mécanique), la condition D correspondant à l'exposition au dispersant seul et la condition contrôle correspondant à l'exposition à de l'eau de mer non contaminée (**Figure 39**). Nous avons réalisé une analyse des activités PO sur différents tissus (branchies, glande digestive et manteau) et différents compartiments hémolympatiques (plasma et HLS).

³⁴ Etêter à 110°C: Eliminer par distillation des composants dont les points d'ébullition sont inférieurs à 110 °C

Dans le but d'intégrer la réponse des activités PO aux effets potentiels des hydrocarbures sur les mécanismes de défense de *C. gigas*, nous avons voulu comparer la modulation de ces activités enzymatiques à celles d'autres enzymes pouvant jouer un rôle similaire à celui des PO chez *C. gigas*, telles que les enzymes antioxydantes SOD, CAT et GPx, ou des enzymes jouant un rôle dans les mécanismes de défense à médiation humorale telles que le lysozyme. Une étude *in vitro* chez *C. gigas* a montré une augmentation de l'activité PO plasmatique en présence de HAP tels que le naphtalène, le benzo(b)fluoranthène et le dibenzo(a,h)anthracène (Bado-Nilles *et al.* 2008) et chez les bivalves, différentes études ont montré que des modulations sur l'activité PO sont souvent accompagnées de modulations d'autres activités enzymatiques, et notamment des activités enzymatiques antioxydantes (Jing *et al.* 2006, Thiagarajan *et al.* 2006, Jing *et al.* 2007). Cependant, à notre connaissance, aucune étude montrant des corrélations significatives entre ces différentes activités n'a été réalisée jusqu'à présent.

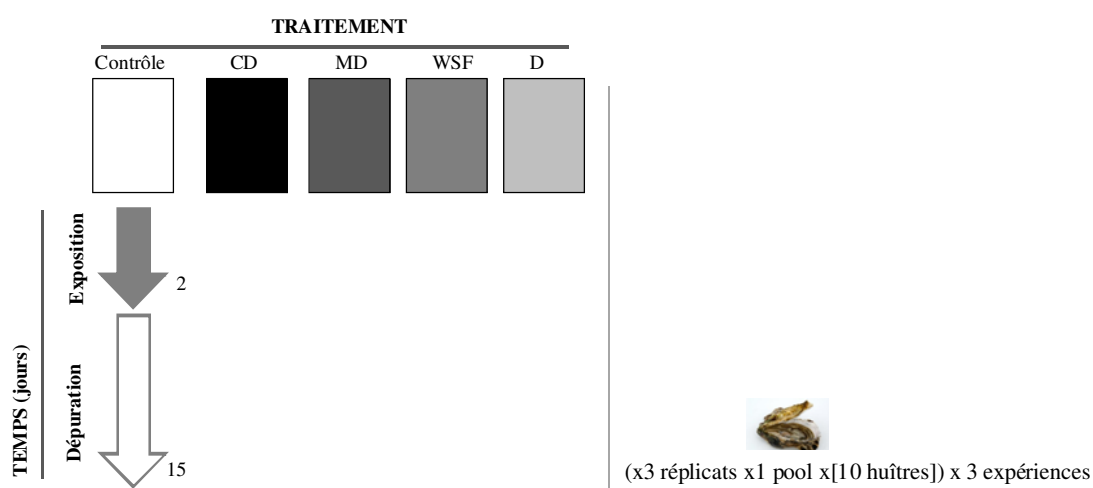


Figure 39 Protocole d'exposition aux hydrocarbures *via* l'eau. CD : dispersant chimique ; MD : dispersion mécanique ; WSF : fraction soluble de l'hydrocarbure ; D : dispersant seul.

Des contaminants chimiques tels que les HAP peuvent provoquer la génération de ROS et induire un stress oxydant chez les organismes aquatiques (Di Giulio *et al.* 1989, Winston 1991). La génération de ROS peut conduire à la production de métabolites toxiques, capables de détruire l'agent pathogène envahisseur. Cependant, les ROS peuvent aussi interagir avec des macromolécules biologiques de l'hôte, ce qui peut conduire à une inhibition de l'activité de plusieurs enzymes, à la peroxydation lipidique (i.e., altération des membranes), à des dommages de l'ADN *via* la formation d'adduits ou encore à la mort cellulaire par apoptose (Cazenave *et al.* 2006). De ce fait, les enzymes antioxydantes sont

souvent utilisées comme des biomarqueurs d'exposition (e.g., Orbea *et al.* 2002). Les PO et plus particulièrement les laccases catalysent l'oxydation de composés aromatiques, tels que les HAP, par un mécanisme indirect impliquant la participation d'un médiateur (Dodor *et al.* 2004). Ainsi, une augmentation de l'activité laccase offrirait une protection contre les effets des HAP bioaccumulés, et donc, les laccases pourraient être utilisées comme des biomarqueurs d'exposition. Il est important de noter que les études sur les réactions d'oxydation des HAP médiées par les laccases ont été réalisées chez les insectes, mais à notre connaissance, aucune étude de ce type n'a été faite chez les bivalves. De plus, dans le cadre d'une activation des mécanismes de défense humoraux tels que les PO, d'autres enzymes peuvent intervenir pour faire face aux attaques par des facteurs de stress tels que les contaminants.

Après 2 jours d'exposition, les résultats indiquent que les teneurs en HAP dans la chair des huîtres sont 2,7 fois plus importantes dans la condition DC que dans la condition DM. Suite à l'exposition aux HAP, les activités enzymatiques étudiées ont généralement été inhibées dans les compartiments hémolymphatiques et tissulaires les plus exposés au milieu extérieur, le plasma et les branchies, ce qui pourrait provoquer à long terme des effets nocifs au niveau de ces compartiments. Au contraire, ces activités enzymatiques ont généralement été activées dans le manteau et les hémocytes, notamment dans la condition DC où les teneurs en HAP étaient plus importantes, ce qui pourrait traduire une activation des systèmes de défense au niveau de ces compartiments. Après 15 jours de dépuration, des différences significatives sont encore observées entre les conditions de contamination et la condition contrôle, ce qui montre qu'un temps de dépuration plus long est requis pour que les activités enzymatiques retournent aux niveaux de base (**Annexe 6**).

De plus, les activités catécholase et laccase sont corrélées aux contenus en HAP des tissus de l'huître (**Tableau 26 ; Annexe 6**). Nous avons observé notamment :

- Une corrélation **positive** entre l'activité **catécholase** dans la glande digestive et la teneur de différents contaminants dans les tissus de *C. gigas*, notamment en **HAP lourds** ($r_s=0,70$, $p<0,01$) ;
- Une corrélation **positive** entre l'activité **laccase** dans les branchies et la teneur de différents contaminants dans les tissus de *C. gigas*, notamment en **fluorène** ($r_s=0,75$, $p<0,01$) ;

- Une corrélation **négative** entre les activités **laccase** dans le plasma et les hémocytes et la teneur en **naphtalène** dans les tissus de *C. gigas* ($r_s = -0,68$ et $-0,66$, $p < 0,01$, respectivement).

D'autre part, après 2 jours d'exposition aux hydrocarbures et de dispersant chimique, l'activité PO est significativement corrélée aux activités CAT, GPx ou SOD, en fonction du tissu (66 mg.l⁻¹ de BAL 110 +/- 3 mg.ml⁻¹ de dispersant ; **Tableau 27**). Ces corrélations peuvent être positives ou négatives (**Tableau 27**). Dans certains cas, les activités catécholase et laccase sont aussi significativement corrélées entre elles ; par exemple, les activités laccase et catécholase sont positivement corrélées dans les hémocytes ($r_s = 0,84$, $p < 0,01$).

L'ensemble de nos résultats suggèrent que l'étude des activités PO de type laccase et catécholase, dans différents tissus et plus particulièrement au niveau du plasma et des branchies de *C. gigas*, pourrait contribuer à évaluer l'effet des hydrocarbures sur des mécanismes de défense de ce bivalve marin.

Quant à l'utilisation des dispersants chimiques comme moyen de lutte antipollution, notamment près des côtes et des estuaires où vivent de nombreux organismes tels que *C. gigas*, l'utilisation de dispersants chimiques favoriserait la bioaccumulation des hydrocarbures dans les huîtres et entraînerait une modulation importante de différentes activités enzymatiques impliquées dans les mécanismes de défense. Cependant, des études supplémentaires sont indispensables avant de pouvoir donner des recommandations sur leur utilisation.

Tableau 26 extrait de l'Annexe 6 Résultats des tests de corrélation de rang de Spearman entre l'activité catécholase (C) ou laccase (L) et la teneur en hydrocarbures dans les huîtres après 2 jours d'exposition à un pétrole de type BAL 100 (66 mg.l⁻¹ de BAL 110 +/- 3 mg.l⁻¹ de dispersant). DBT : dibenzothiophène ; Fen : phénanthrène ; Ant : anthracène; HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques.

	Branchies		Glande digestive		Manteau		Plasma		Hémocytes	
	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L
Naphtalène	ns	ns	0,69	ns	ns	ns	ns	-0,68	ns	-0,66
Naphtalène alkylé	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Benzo(c)phénanthrène	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Acénaphthylène	ns	0,68	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Acénaphène	ns	0,65	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Fluorène	ns	0,75	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Fluorène alkylé	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DBT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DBT alkylé	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Fen	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ant	ns	ns	0,65	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Fen/Ant alkylé	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Fluoranthène	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
∑ HAP légers	ns	ns	0,65	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
∑ HAP lourds	ns	ns	0,70	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
∑ HAP totaux	ns	ns	0,64	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tableau 27 Résultats des tests de corrélation de rang de Spearman sur les réponses biologiques dans différents tissus de *Crassostrea gigas* exposée à des hydrocarbures dispersés chimiquement ou mécaniquement, pendant 2 jours. ns: pas de corrélations significatives ($p > 0,01$). SOD: superoxyde dismutase; GPx: glutathion peroxydase; HLS: surnageant de lysat hémocytaire ; nd: non déterminé.

		SOD	Catalase	GPx	Catécholase	Laccase	Lysozyme
Branchies	SOD	1,00					
	Catalase	ns	1,00				
	GPx	ns	ns	1,00			
	Catécholase	ns	ns	ns	1,00		
	Laccase	0,74	ns	ns	ns	1,00	
	Lysozyme	ns	ns	ns	ns	ns	1,00
Glande digestive	SOD	1,00					
	Catalase	ns	1,00				
	GPx	ns	-0,69	1,00			
	Catécholase	ns	0,75	ns	1,00		
	Laccase	ns	ns	ns	ns	1,00	
	Lysozyme	ns	ns	ns	0,75	ns	1,00
Manteau	SOD	1,00					
	Catalase	ns	1,00				
	GPx	ns	ns	1,00			
	Catécholase	ns	ns	ns	1,00		
	Laccase	ns	ns	ns	ns	1,00	
	Lysozyme	ns	ns	ns	ns	ns	1,00
Plasma	SOD	1,00					
	Catalase	ns	1,00				
	GPx	ns	ns	1,00			
	Catécholase	ns	-0,61	ns	1,00		
	Laccase	ns	ns	ns	ns	1,00	
	Lysozyme	ns	ns	ns	ns	ns	1,00
HLS	SOD	1,00					
	Catalase	ns	1,00				
	GPx	0,91	ns	1,00			
	Catécholase	0,68	ns	0,64	1,00		
	Laccase	ns	ns	ns	0,84	1,00	nd

Après avoir testé la voie de contamination par l'eau, nous avons testé la voie de contamination par le sédiment. Dans ce cas, de la vase, caractéristique des vasières intertidales des Pertuis Charentais, a été contaminée par du BAL 110. Pour ceci, 2,4 m² de vase ont été contaminés avec 265 mg.l⁻¹ de BAL 110, pendant 2 jours et en utilisant un cycle de marée de 6h de marée haute et 6 heures de marée basse (6h/6h). Du dispersant chimique (5%) a été utilisé pour favoriser la pénétration des hydrocarbures dans la vase. Cette vase contaminée a été transférée ensuite dans un mésocosme de 1 000 l. Les huîtres ont été mises en contact avec cette vase pendant 10 jours. Un second mésocosme, avec des huîtres mises en contact avec de la vase non contaminée, a servi de contrôle. Un dispositif a permis de réaliser un cycle de marée artificiel (6h/6h) dans chacun des mésocosmes, pendant les 10 jours de l'expérience. Des huîtres ont été prélevées après 5, 7 et 10 jours d'exposition (**Figure 40**).

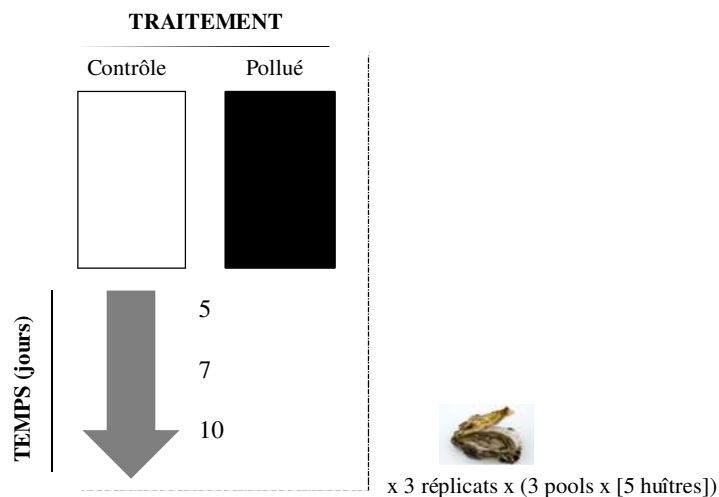


Figure 40 Protocole d'exposition à de la vase contaminée aux hydrocarbures

Dans ce cas, nous avons réalisé nos analyses seulement dans le plasma, compartiment hémolympatique pour lequel nous avons observé au préalable des modulations des activités enzymatiques importantes, dans les expériences d'exposition aux hydrocarbures *via* l'eau. Nous avons étudié les activités enzymatiques catécholase, laccase, GPx et lysozyme.

Concernant les activités PO, les résultats ont révélé une augmentation de l'activité laccase et surtout de l'activité catécholase après 10 jours d'exposition à de la vase contaminée aux hydrocarbures (**Annexe 7**). Les activités laccase et catécholase dans le

plasma sont positivement corrélées à l'activité GPx ($r_s=0,83$ et $r_s=0,85$, $p<0,01$, respectivement ; **Tableau 28**).

Tableau 28 Résultats des tests de corrélation de rang de Spearman sur les réponses biologiques dans le plasma de *C. gigas* exposées à de la vase contaminé aux hydrocarbures, pendant 10 jours. ns: pas de corrélation significative ($p<0,01$). SOD: superoxyde dismutase; GPx: glutathion peroxydase; PO: phénoloxydase.

	SOD	GPx	Catécholase	Laccase	Lysozyme
SOD	1,00				
GPx	ns	1,00			
Catécholase	ns	0,83	1,00		
Laccase	ns	0,85	0,70	1,00	
Lysozyme	ns	-0,83	ns	ns	1,00

Ces résultats suggèrent que l'exposition aux hydrocarbures provoquerait un stress oxydant chez *C. gigas* et que les PO pourraient jouer un rôle antioxydant chez cette espèce. Cependant, nous ne sommes pas dans la mesure de dire si ces effets ont été dus à une exposition 1) *via* des particules sédimentaires contaminées, ou bien si le sédiment a relargué des contaminants et l'exposition des huîtres aux hydrocarbures s'est faite 2) *via* l'eau.

Pour résumer, nous avons pu mettre en évidence la modulation des activités catécholase et laccase dans le plasma de *C. gigas*, par trois expériences d'exposition différentes, avec des temps exposition et concentrations en contaminants distincts, confirmant l'intérêt d'intégrer l'étude de ces activités enzymatiques dans une approche multi-biomarqueurs, voire multi-tissus, pour évaluer l'effet des contaminants sur les mécanismes de défense de cette espèce. L'ensemble des expériences et des principaux résultats obtenus sur la modulation des activités PO au cours de ce chapitre sont présentés dans le **Tableau 29**.

Tableau 29 Récapitulatif des expériences et principaux résultats obtenus sur la modulation des activités PO chez *C. gigas* suite à l'exposition à des contaminants organiques *in vivo*. ↑, ↓, ns : diminution, augmentation ou pas de différence significative par rapport au contrôle HL : hémolymphe; Hc : hémocytes; HLS : surnageant de lysat hémocytaire; P : plasma; B : branchies; GD : glande digestive; M : manteau; BAL 110 : pétrole brut léger Arabian light, étêté à 110°C ; « - » : non testé.

Contaminant	Voie de contamination	Concentration	Temps	Tissu ou compartiment hémolympatique	Activité catécholase	Activité laccase	Ratio de l'expression relative de l'ARNm correspondant au gène codant pour la laccase par rapport au contrôle	Annexe
Diuron	Eau	1 µg.l ⁻¹	24 h	P	-	A 2h: ↓ 40% A 6h : ↓ 50% A 24h : ns	-	5
				Hc	-	-	A 2h : ↓ à 0,5 A 6h : ↑ à 2 A 24 h : ↓ à 0,5	5
Diuron, isoproturon, ibuprofène	Eau	5 µg.l ⁻¹	6 h	P	A 1 h: ns A 3 h: ns A 6 h : ↓ 35%	-	-	5
BAL 110 +5% dispersant chimique	Eau	66 mg.l ⁻¹	2 jours	B	A 2 jours : ↓ 30 %	A 2 jours : ↑ x1,5	-	6
				GD	A 2 jours : ns	A 2 jours : ns	-	6
				M	A 2 jours : ↓ 20 %	A 2 jours : ↑ x1,2	-	6
				P	A 2 jours : ns	A 2 jours : ↓ 100 %	-	6
				HLS	A 2 jours : ns	A 2 jours : ns	-	6
BAL 110 sans dispersant chimique	Eau	66 mg.l ⁻¹	2 jours	B	A 2 jours : ns	A 2 jours : ↑ x1,7	-	6
				GD	A 2 jours : ns	A 2 jours : ns	-	6
				M	A 2 jours : ↓ 20 %	A 2 jours : ns	-	6
				P	A 2 jours : ns	A 2 jours : ns	-	6
				HLS	A 2 jours : ↑ x2	A 2 jours : ↑ x2	-	6
BAL 110 +5% dispersant chimique	Sédiment et/ou Eau (vase contaminée)	220 mg.kg de poids sec de sédiment ⁻¹	10 jours	P	A 10 jours : ↑ x 2	A 10 jours : ↑ x 1,25 (mais ns)	-	7

CHAPITRE 3 : Potentiel des phénoloxydases comme biomarqueur de stress dans des études de biosurveillance *in situ*

Le troisième chapitre de cette thèse porte sur la modulation des activités PO chez *C. gigas*, dans les études de biosurveillance de la qualité de l'eau lors d'approches *in situ*. Pour ce chapitre, une première partie a consisté à étudier les variations saisonnières des PO chez *C. gigas*, et à dégager plusieurs hypothèses sur les principaux facteurs responsables de ces modulations tels que la présence de contaminants organiques dans le milieu. La deuxième partie de ce chapitre a consisté à comparer la réponse des activités PO chez *C. gigas*, avec la teneur en contaminants dans la chair des huîtres (hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), polychlorobiphényles (PCB), polybromodiphényléthers (PBDE), pesticides organochlorés (OCP)) d'animaux ayant été transplantés à différents sites de la côte Atlantique française, notamment en Charente-Maritime, première région productrice d'huîtres en France. Cette étude a été réalisée dans le but d'évaluer le potentiel des PO comme biomarqueurs de stress environnemental lié à la présence de contaminants organiques dans le milieu naturel.

Partie 1 : Implication des facteurs environnementaux dans les variations saisonnières des activités phénoloxydase



Source : <https://www.marenes.fr>

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

1. Variations physiologiques saisonnières de l'activité phénoloxydase

En théorie, un biomarqueur idéal doit varier sur le terrain de façon spécifique à la présence d'un ou plusieurs contaminants. Cependant, dans la pratique, la variation de réponse des biomarqueurs d'exposition ou d'effet des contaminants chimiques est un problème majeur dans l'évaluation de la surveillance de la qualité des eaux côtières et estuariennes. Outre la présence de contaminants dans le milieu, plusieurs facteurs internes et externes tels que la lignée génétique, le sexe, l'âge, le statut reproducteur, le régime alimentaire et la température du milieu environnant vont moduler la réponse des biomarqueurs (Barnhart, 1969). Un biomarqueur n'est généralement validé que lorsque ces problèmes de variabilité sont maîtrisés.

Chez le crabe vert *Carcinus maenas*, les maxima d'activité de la PO sont constatés en septembre et en octobre (Hauton et al. 1997), qui correspond également au maximum d'abondance bactérienne, ce qui suggère que l'augmentation de l'activité PO serait due à une transformation de la proPO en PO en réponse à la présence de composés dérivés des bactéries présents dans la colonne d'eau.

Chez l'ormeau, *Haliotis tuberculata*, des épisodes de mortalité ont lieu en France depuis 1998 et seraient associées à une infection par *Vibrio harveyi* (Travers et al. 2008). Les mortalités ont lieu principalement en septembre, à une période où la température de l'eau est élevée et où la reproduction de l'ormeau a lieu. Il a été suggéré qu'une réallocation de l'énergie vers la reproduction entraînerait une diminution des capacités de défense à cette période de l'année et pourrait faciliter l'infection par *V. harveyi*. Durant la gamétogénèse, les auteurs ont observé que la phagocytose et l'activité PO étaient réduites, puis en

rassemblant l'ensemble des données obtenues sur les différents paramètres étudiés, les auteurs ont trouvé une relation importante entre les processus de maturation et de reproduction, le statut immunitaire et la susceptibilité à *V. harveyi*.

Chez les bivalves, les défenses immunitaires sont connues aussi pour être modulées en fonction de la saison (Auffret & Oubella 1994, Oliver & Fisher 1995). L'hiver est connu, par exemple, comme étant la période où le stress oxydant est le plus important (Manduzio *et al.* 2004). De plus, une étude réalisée récemment sur *C. gigas* a montré que la phagocytose était plus faible pendant la période de reproduction en été et atteignait un maximum en automne (Duchemin *et al.* 2007). Sur la côte Atlantique française, la maturation des gamètes dans *C. gigas* a lieu entre mai et juin, puis la reproduction a lieu l'été et, après la période de ponte, le rythme de croissance redevient important en automne (Soletchnik *et al.* 2006). L'ensemble des résultats de l'étude de Duchemin *et al.* (2007) suggèrent alors qu'une dépression du statut immunitaire aurait lieu à la fin du printemps, c'est-à-dire lorsque la reproduction commence, et pourrait être un des facteurs favorisant les épisodes de mortalité estivale. L'ensemble de ces études montre alors qu'il est très important de connaître les variations saisonnières des biomarqueurs, spécialement si ces derniers sont utilisés pour réaliser un suivi de la présence et/ou de l'effet des contaminants *in situ*.

2. Facteurs environnementaux susceptibles de moduler l'activité phénoloxydase

Outre la température, le statut reproducteur ou la présence d'agents pathogènes dans le milieu, d'autres facteurs sont susceptibles de moduler les capacités de défense (**Tableau 30**). Dans le cas des PO, quelques exemples sont présentés dans le **Tableau 31**.

Tableau 30 Facteurs pouvant avoir un effet sur les réponses immunitaires chez les bivalves. Modifié selon Samain 2007

Facteur	Effet
Environnement (température, saison)	A de faibles températures, les processus métaboliques, la fluidité, la perméabilité de la membrane cellulaire, les activités enzymatiques et la communication cellulaire sont souvent diminués.
Condition d'élevage en ostréiculture (manipulation, densité)	Une manipulation trop fréquente ou une très forte densité dans les bassins ostréicoles peuvent induire une immunodépression comme un stress secondaire.
Contamination	Les effets vont dépendre de la nature de la substance, ils peuvent provoquer un stress ou être immunosuppresseurs.
Nutrition (qualité de la nourriture et disponibilité de la nourriture)	Une faible disponibilité en nourriture ou de nourriture n'ayant pas les éléments nutritifs nécessaires au bon développement de l'organisme peuvent induire des effets immunosuppresseurs.
Pathogène	Le type, la virulence et le niveau d'infection influent sur la capacité de l'animal à répondre à une infection par un pathogène.
Physiologique ou biologique	La variation individuelle, l'âge, l'espèce ou la lignée vont avoir des effets variés sur les réponses immunitaires.
Génétique	Les différences dans la capacité à développer des réponses immunitaires non spécifiques vont faire que certaines lignées soient plus résistantes à différentes sources de stress que d'autres.

Tableau 31 Exemples de facteurs ayant un effet sur l'activité PO chez les bivalves. ↑, ↓ : augmentation et diminution par rapport au contrôle, respectivement ; O₂ : oxygène ; T°C : température, NH₃ : ammoniac ; MgCl₂ : chlorure de magnésium ; NA : noradrénaline ; P : plasma ; HL : hémolymphe totale ; P : plasma ; Hc : hémocytes.

Organisme	Tissu	Paramètre	Conditions expérimentales	Durée de l'expérience	Résultats	Références
Facteurs physico-chimiques						
Huître <i>Saccostrea glomerata</i>	HL (P)	↓ salinité	13,5 ou 6,8 (Contrôle: 33,8)	12 jours	↓ 50% et 80%, respectivement	Butt <i>et al.</i> 2006
	HL	↑ MgCl ₂ (anesthésique quand utilisé à de fortes concentrations)	50 g.l ⁻¹ puis dépuration ensuite dans de l'eau de mer sans MgCl ₂	3h	↓ 50% après 48h et récupération après 96h	Butt <i>et al.</i> 2008
Clam <i>Macrta veneriformis</i>	HL (Hc)	↓ O ₂ (hypoxie)	3 et 1,5 mg.l ⁻¹ O ₂	24, 48 et 72h	↓ 20, 30 et 70% respectivement	Yu <i>et al.</i> 2010
Facteurs nutritionnels						
Huître <i>Saccostrea glomerata</i>	HL	↓ nourriture	Diminution de moitié de la quantité de nourriture par rapport au contrôle pendant 3 semaines, suivie d'une période de récupération de 6 jours	3 semaines	↓ 14%	Butt <i>et al.</i> 2007
Facteurs biologiques						
Huître <i>Saccostrea glomerata</i>	HL	↑ NA	Injection de 10 ng.ml ⁻¹	60 min	A 30 min: ↓ 50% A 60 min: récupération De plus, la concentration en NA dans les huîtres augmente avec les faibles et les fortes salinités (10 et 40) et avec les faibles et fortes températures (12 et 40°C)	Aladaileh <i>et al.</i> 2008

DEMARCHE SCIENTIFIQUE ET PRINCIPAUX RESULTATS

Le système immunitaire est une cible importante pour de nombreux contaminants dans l'environnement. De plus, comme cela a été évoqué précédemment, une large gamme de facteurs externes et internes à l'organisme peut moduler le système immunitaire. Les réponses biologiques impliquées dans les mécanismes de défense peuvent donc offrir une vision intégrée de l'effet des contaminants sur des organismes exposés à différentes sources de stress. Mais, il est indispensable pour cela de connaître les variations saisonnières du paramètre que l'on veut étudier. En effet, plus la réponse du biomarqueur variera durant l'année, plus ce sera difficile de discriminer l'effet dû aux contaminants chimiques par rapport aux variations physiologiques naturelles.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons pu bénéficier d'un sous-échantillonnage d'huîtres d'une étude s'intéressant à la bioaccumulation des métaux (Programme Interrégional Défi Cadmium). Ainsi, nous avons pu étudier la réponse des activités PO dans des huîtres présentes sur le terrain et comparer les niveaux d'activité des PO par rapport à la teneur à différents contaminants organiques dans les huîtres. Nous nous sommes intéressés aux contaminants organiques : hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), polychlorobiphényles (PCB), polybromodiphényléthers (PBDE) et pesticides organochlorés (OCP). Ces contaminants organiques ont été choisis du fait de leur importante persistance dans les milieux naturels et pour leurs effets potentiels sur les défenses immunitaires des organismes aquatiques.

Des huîtres juvéniles provenant d'une éclosérie en France, localisée dans un site décrit comme étant de référence (Geffard *et al.* 2002), ont été transférées vers différents sites du bassin de Marennes-Oléron, correspondant à la principale région productrice d'huîtres de France. Des huîtres ont également été transférées dans un site de l'estuaire de la Gironde, considéré comme le plus grand estuaire d'Europe occidentale (**Figure 41**). Les sites choisis dans le bassin de Marennes-Oléron sont : Boyard (BOY; 45° 58' 0" Nord, 1° 15' 0" Ouest), influencé par La Gironde et La Charente ; Les Palles (LP; 45° 58' 0" Nord,

1° 08' 0" Ouest), fortement influencé par La Charente ; Mus du Loup (ML; 45° 46' 10" Nord, 1° 08' 30" Ouest), influencé par La Seudre. Le site choisi dans l'estuaire de la Gironde est : Cordouan (C; 45° 35' 11" Nord, 1° 10' 24" Ouest), site fortement influencé par La Gironde. Tous les animaux provenaient de la même cohorte de façon à réduire la variabilité génotypique. Les jeunes huîtres ont été mises dans des poches ostréicoles, à une hauteur de 40 cm du substrat dans les différents sites pendant une période de trois mois. Les animaux ont ensuite été collectés en début d'été, en début d'automne et en début d'hiver (en juin, septembre et décembre 2008, respectivement).

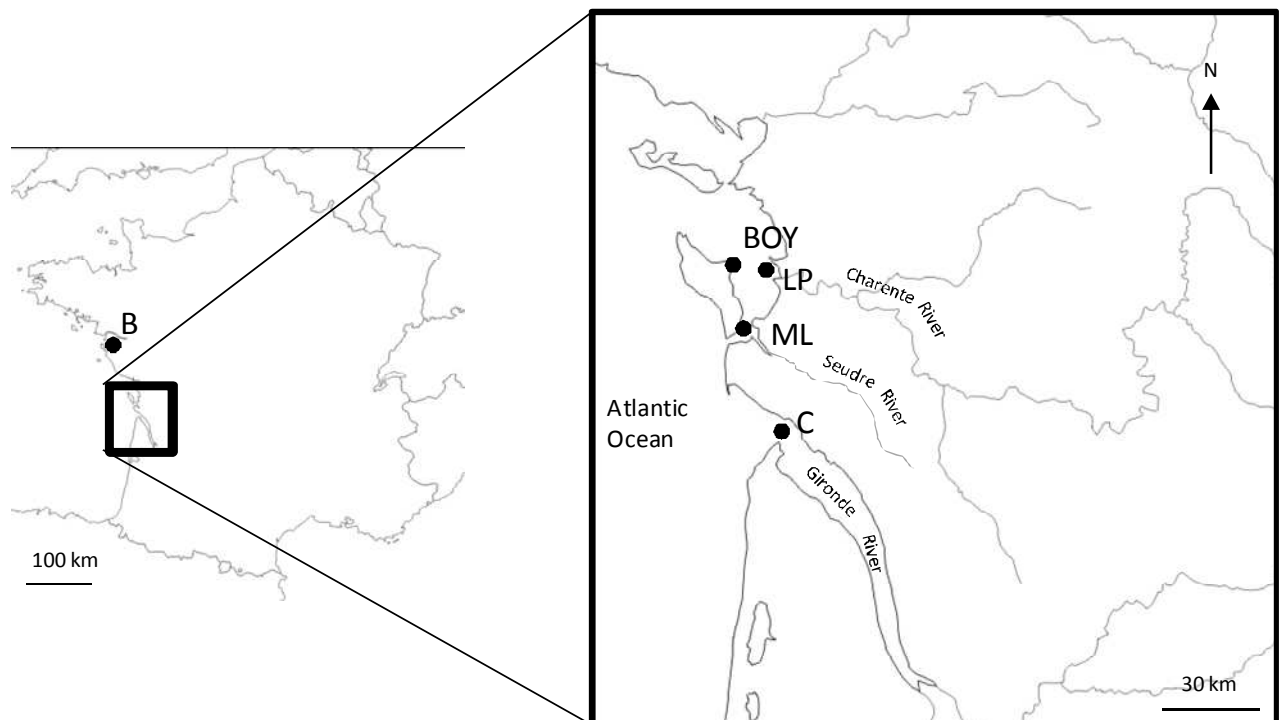


Figure 41 extraite de l'Annexe 8 Aire d'échantillonnage sur la côte Atlantique française. Localisation du site de référence, Bouin (B), et des sites de transplantation à Marennes-Oléron (Boyard, BOY, Les Palles, LP, Mus du Loup, ML) et dans l'estuaire de la Gironde (C)

Nous avons étudié tout d'abord la variation saisonnière de différentes activités enzymatiques d'intérêt dans le plasma et dans différents tissus d'huîtres provenant du site de référence. L'activité PO de type catécholase, dosée dans le plasma, n'a pas présenté de variations saisonnières dans le site de référence (**Luna-Acosta *et al.*, 2010b ; Annexe 8**).

Nous avons ensuite réalisé des analyses de la teneur en contaminants à deux saisons ayant des températures contrastées, l'été et l'hiver. Les analyses sur la teneur en contaminants entre les différents sites ont montré qu'il existe de faibles différences entre la teneur en contaminants dans les huîtres provenant du site de référence par rapport aux huîtres provenant des sites de transplantation (**Tableau 32 ; Annexe 9**). Ceci nous a permis néanmoins 1) d'étudier l'effet de la transplantation sur la physiologie globale de l'huître, évaluée principalement à travers l'indice de condition, et 2) de rassembler l'ensemble des données pour étudier la variabilité saisonnière des activités PO.

L'indice de condition augmente en été en suivant le gradient Sud-Nord des transplantations. En hiver, aucune différence significative n'a été observée entre les différents sites (**Annexe 9**). Ces résultats suggèrent que la transplantation n'a pas eu d'effet négatif sur la physiologie globale des animaux.

Concernant les activités enzymatiques, tous sites confondus, l'activité laccase ne varie pas dans les tissus de façon significative entre les deux saisons que nous avons choisies pour notre étude, l'été et l'hiver, mis à part pour la glande digestive (**Tableau 33**). En revanche l'activité catécholase ne varie pas entre les deux saisons dans la glande digestive, mais elle varie dans tous les autres tissus (**Tableau 33**). Généralement chez les bivalves, les défenses immunitaires diminuent l'été et augmentent l'hiver (Manduzio *et al.* 2004). En effet, chez *C. gigas*, l'activité laccase dans la glande digestive est environ 1,5 plus élevée l'hiver (moyenne de température, $T = 9 \pm 2^\circ\text{C}$), en comparaison avec l'été ($T = 20 \pm 2^\circ\text{C}$), et l'activité catécholase dans le plasma est environ 2 fois plus élevée en hiver qu'en été. Cependant, les activités catécholase des branchies et du manteau sont respectivement 30 et 40 % plus faibles en hiver qu'en été. Ces derniers résultats sont en accord avec d'autres études menées dans des conditions de laboratoire et chez d'autres espèces d'invertébrés, qui ont montré qu'une diminution de la température pouvait provoquer une diminution de l'activité PO dans des organismes aquatiques (Cheng & Chen 2000, Gomez-Jimenez *et al.* 2000).

Dans tous les cas, l'ensemble de ces résultats montre que les activités catécholase et laccase chez *C. gigas* peuvent être modulées en fonctions des saisons, et ceci, en fonction du tissu étudié.

Malgré le fait que nous avons eu de faibles différences sur la teneur en contaminants entre les différents sites, nous avons comparé par la suite les modulations des activités enzymatiques à la teneur en différents contaminants organiques (HAP, PCB, PBDE, OCP) dans la chair des huîtres, dans le but d'étudier les relations potentielles entre la présence de contaminants dans les huîtres et la réponse des PO.

Tableau 32 Synthèse sur la teneur en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), en polychlorobiphényles (PCB), en polybromodiphényléthers (PBDE) et en pesticides organochlorés (OCP) dans les huîtres ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids sec). B : Bouin, BOY : Boyard, LP : Les Palles, ML : Mus du Loup, C : Cordouan * différences significatives ($p < 0,05$) avec B; les lettres minuscules a, b et c indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents sites de transplantation.

	Concentration ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids sec)									
	Été					Hiver				
	B	BOY	LP	ML	C	B	BOY	LP	ML	C
Σ HAP	129 ± 6	139 ± 19 ^{a,b}	189 ± 25 ^a	81 ± 11 ^b	80 ± 32 ^{a,b}	155 ± 25	236 ± 43 ^{*,a}	205 ± 9 ^a	200 ± 40 ^a	120 ± 16 ^b
Σ PCB	81 ± 9	30 ± 3 [*]	23 ± 4 [*]	15 ± 1 [*]	39 ± 12 [*]	89 ± 39	47 ± 3 [*]	30 ± 3 [*]	17 ± 6 [*]	44 ± 4 [*]
Σ PBDE	0,9 ± 0,0	0,4 ± 0,4	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,0	0,9 ± 0,2	2,9 ± 0,7	0,6 ± 0,3 [*]	1,0 ± 0,7 [*]	0,6 ± 0,1 [*]	0,5 ± 0,1 [*]
Σ OCP	11 ± 2	11 ± 1 ^a	8 ± 0 ^{a,b}	3 ± 0 ^{*,b}	4 ± 0 ^{*,b}	10 ± 5	19 ± 1 ^{*,a}	15 ± 3 ^{a,c}	5 ± 0 ^{b,c}	11 ± 1 ^c

Tableau 33 Variations saisonnières des activités catécholase et laccase chez *Crassostrea gigas* dans les huîtres provenant du site de référence et des sites de transplantation. T = température. \uparrow , \downarrow , ns : augmentation, diminution ou pas de variation sur l'activité enzymatique en été par rapport à l'hiver.

Activité	Tissu	Saison		Analyses statistiques		Comparaison été / hiver
		Été (T = 20±2°C)	Hiver (T = 9±2°C)	F _{1,28} =	p=	
Catécholase	Branchies	35,62 ± 4,51	25,02 ± 7,67	18,62	<0,001	\uparrow
	Glande digestive	60,50 ± 23,35	65,72 ± 23,80	0,42	0,52	ns
	Manteau	65,81 ± 35,96	37,75 ± 25,38	5,42	0,03	\uparrow
	Plasma	34,15 ± 10,54	63,10 ± 24,12	18,94	<0,001	\downarrow
Laccase	Branchies	7,75 ± 1,10	8,56 ± 3,25	0,81	0,37	ns
	Glande digestive	3,41 ± 1,99	4,95 ± 1,66	5,67	0,02	\downarrow
	Manteau	6,38 ± 3,80	6,39 ± 4,14	0,05	0,97	ns
	Plasma	5,53 ± 0,49	3,36 ± 0,52	2,61	0,12	ns

Partie 2 : Effets d'une transplantation *in situ* sur les activités phénoloxydase et la teneur en contaminants organiques



Source : <http://static.skynetblogs.be/>

DEMARCHE SCIENTIFIQUE ET PRINCIPAUX RESULTATS

Des dosages en HAP, PCB, PBDE et OCP ont été réalisés sur des individus provenant de l'expérience de transplantation présentée précédemment.

L'analyse sur la teneur de ces contaminants dans les huîtres (**Tableau 32**) a permis de mettre en évidence deux choses :

- 1) Que le site de référence (B) possède une teneur en PCB élevée ;
- 2) Qu'il n'existe pas de différence importante entre les sites de transplantation dans le bassin de Marennes-Oléron et l'estuaire de la Gironde, et que, concernant les contaminants organiques que nous avons dosé, il s'agit de sites faiblement contaminés.

Néanmoins, malgré le fait que nous ayons obtenu de faibles différences entre les sites, des corrélations significatives ont été observées entre les activités catécholase et laccase et la teneur en HAP, PCB, PBDE ou OCP, en fonction du tissu analysé (**Tableau 34**).

En été, les activités PO sont corrélées surtout à la teneur en PCB et en OCP. En hiver, les activités PO sont corrélées surtout à la teneur en HAP, et surtout aux formes parentales des HAP ou bien aux HAP lourds. Indépendamment de la saison, les activités PO sont surtout corrélées aux teneurs en HAP et en PCB.

Sur l'année, les activités catécholase et laccase dans les branchies sont négativement corrélées ($r_s = -0,71$ et $-0,54$, $p < 0,01$, respectivement) à la teneur en HAP dans les huîtres. Par contre, l'activité catécholase dans le plasma est positivement corrélée ($r_s = 0,70$, $p < 0,01$) à la teneur en HAP dans les huîtres.

Tableau 34 Résultats des tests de corrélation de rang de Spearman entre l'activité catécholase (C) ou laccase (L) et la teneur en contaminants dans les huîtres après trois mois de transplantation de Bouin (Vendée) à différents sites de Marennes-Oléron et de l'estuaire de la Gironde, en été ou en hiver. HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques ; PCB : polychlorobiphényles, PBDE : polybromodiphényléthers ; OCP : pesticides organochlorés ; ns : pas de corrélations significatives ($p > 0,01$).

	Branchies		Glande digestive		Manteau		Plasma	
	C	L	C	L	C	L	C	L
Eté								
∑ HAP légers	-0,69	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
∑ HAP lourds	ns	ns	ns	-0,77	ns	ns	ns	ns
∑ HAP composés parentaux	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
∑ HAP alkylés	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
∑ HAP totaux	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
∑ PCB	ns	ns	ns	ns	-0,65	ns	ns	0,72
∑ PBDE	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
∑ OCP	ns	ns	ns	ns	-0,68	ns	ns	0,72
Hiver								
∑ HAP légers	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
∑ HAP lourds	-0,68	-0,84	ns	ns	ns	-0,68	0,78	ns
∑ HAP composés parentaux	-0,66	-0,84	ns	ns	ns	-0,65	0,80	ns
∑ HAP alkylés	ns	ns	-0,65	ns	ns	ns	ns	ns
∑ HAP totaux	-0,70	-0,79	ns	ns	ns	ns	0,75	ns
∑ PCB	ns	ns	-0,69	ns	ns	ns	ns	0,78
∑ PBDE	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
∑ OCP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sur l'année								
∑ HAP légers	-0,54	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
∑ HAP lourds	-0,64	-0,57	ns	ns	ns	ns	0,65	ns
∑ HAP composés parentaux	-0,69	-0,57	ns	ns	ns	ns	0,69	ns
∑ HAP alkylés	-0,50	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
∑ HAP totaux	-0,71	-0,54	ns	ns	ns	ns	0,70	ns
∑ PCB	ns	ns	-0,60	0,47	ns	0,52	ns	0,57
∑ PBDE	ns	ns	ns	0,57	ns	0,47	ns	ns
∑ OCP	-0,52	ns	ns	ns	-0,59	ns	ns	ns

Concernant les PCB, l'activité catécholase dans la glande digestive est négativement corrélée à la teneur en PCB dans les huîtres ($r_s = -0,60$, $p < 0,01$). Au contraire, l'activité laccase dans la glande digestive, dans le manteau et dans le plasma, sont positivement corrélées à la teneur en PCB ($r_s = 0,47$, $0,52$ et $0,57$, $p < 0,01$, respectivement). L'activité laccase dans la glande digestive et dans le manteau sont positivement corrélées à la teneur en PBDE ($r_s = 0,57$ et $0,47$, $p < 0,01$, respectivement). L'activité catécholase dans les branchies et le manteau sont négativement corrélées à la teneur en OCP dans les huîtres ($r_s = -0,52$ et $-0,59$, $p < 0,01$, respectivement).

De plus, les activités catécholase ou laccase sont corrélées de façon significative avec les activités des enzymes antioxydantes. En effet, malgré le fait qu'aucune corrélation significative n'est observée durant l'été (**Tableau 35**), des corrélations significatives sont observées l'hiver (**Tableau 36**). Sur l'année, seule l'activité catécholase dans le plasma est positivement corrélée aux activités GPx ($r_s = 0,48$, $p < 0,01$; **Tableau 37**). L'ensemble de ces résultats et surtout les corrélations positives avec les activités d'enzymes antioxydantes suggèrent que les catécholases et les laccases jouent un rôle antioxydant chez les bivalves. D'autre part, les intermédiaires des PO peuvent générer des O_2^- (Nappi & Vass 2001). En effet, une augmentation de l'activité PO suite à une exposition aux hydrocarbures pourrait indirectement produire des radicaux libres qui, par conséquent, induiraient un stress oxydant et des dommages moléculaires ou biochimiques. Les peroxydes lipidiques, dérivés d'acides gras polyinsaturés, sont instables et forment des complexes avec des séries de composés, incluant les composés carbonyles, parmi lesquels le plus abondant est le malondialdéhyde (MDA ; Gerard-Monnier *et al.* 1998). Dans l'étude de transplantation *in situ*, l'activité catécholase dans la glande digestive était positivement corrélée au taux de MDA l'été, l'activité laccase était négativement corrélée au taux de MDA l'hiver ($r_s = 0,66$ et $-0,86$, respectivement, $p < 0,01$; **Tableaux 35 et 36**). Et sur l'année, seule l'activité laccase de la glande digestive était négativement corrélée au taux de MDA ($r_s = -0,60$, $p < 0,01$; **Tableau 35**).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que 1) l'activation de l'activité laccase et d'autres enzymes antioxydantes n'est pas suffisante pour réduire le contenu de ROS généré par l'exposition aux contaminants ou 2) qu'une suractivation des laccases est à

l'origine d'une génération élevée de ROS ce qui produirait un stress oxydant chez l'organisme.

D'autre part, les activités catécholase et lysozyme dans le plasma sont positivement corrélées l'été ($r_s=0,78$, $p<0,01$), mais pas l'hiver ni sur l'année (**Tableaux 35, 36 et 37**, respectivement). Chez les invertébrés, les lysozymes jouent un rôle dans les défenses immunitaires de type humoral mais également dans la détoxification des contaminants. Du fait des propriétés des PO, ces dernières pourraient jouer également un rôle dans ces deux types de processus.

De façon générale, nous n'avons pas observé d'importantes variations saisonnières, suggérant que des facteurs telles que la température, la nourriture et le statut reproducteur n'affecteraient pas ou peu les activités PO chez *C. gigas in situ* (**Annexe 9**). Cependant, aucune tendance générale n'a pu être observée par rapport à l'effet des contaminants sur les activités PO chez *C. gigas*. Ceci peut être dû au fait que le site de référence possédait des teneurs élevées en PCB et qu'il n'y avait pas de différence suffisamment contrastante sur les concentrations des contaminants dosés entre les différents sites de transplantation.

Néanmoins, l'ensemble des résultats et notamment les corrélations observées entre activités enzymatiques et teneurs en contaminants dans les huîtres, suggèrent que, dans certains cas de figure (en fonction du tissu choisi et de l'activité analysée), les PO chez *C. gigas* pourraient être utilisées pour étudier l'exposition et/ou l'effet des contaminants dans le milieu naturel, et ceci, indépendamment de la saison.

Tableau 35 Résultats des tests de corrélation de rang de Spearman sur les réponses biologiques dans différents tissus de *C. gigas* transplantés dans différents sites de la côte Atlantique française, pendant trois mois, en été. ns: Corrélations non significatives ($p < 0,01$). SOD: superoxyde dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathion peroxydase; MDA: malondialdéhyde.

		SOD	CAT	GPx	MDA	Catécholase	Laccase	Lysozyme
Branchies	SOD	1,00						
	CAT	ns	1,00					
	GPx	ns	ns	1,00				
	MDA	ns	ns	ns	1,00			
	Catécholase	ns	ns	ns	ns	1,00		
	Laccase	ns	ns	ns	ns	ns	1,00	
	Lysozyme	0,82	ns	ns	ns	ns	ns	1,00
Glande digestive	SOD	1,00						
	CAT	ns	1,00					
	GPx	ns	-0,70	1,00				
	MDA	ns	ns	ns	1,00			
	Catécholase	ns	ns	ns	0,66	1,00		
	Laccase	ns	ns	ns	ns	-0,73	1,00	
	Lysozyme	ns	-0,71	0,78	ns	ns	ns	1,00
Manteau	SOD	1,00						
	CAT	ns	1,00					
	GPx	ns	ns	1,00				
	Catécholase	ns	ns	ns	nd	1,00		
	Laccase	ns	ns	ns	nd	ns	1,00	
	Lysozyme	ns	ns	ns	-0,67	ns	ns	1,00
Plasma	SOD	1,00						
	CAT	ns	1,00					
	GPx	ns	ns	1,00				
	Catécholase	ns	ns	ns	nd	1,00		
	Laccase	ns	ns	ns	nd	ns	1,00	
	Lysozyme	ns	ns	ns	nd	0,78	ns	1,00

Tableau 36 Résultats des tests de corrélation de rang de Spearman sur les réponses biologiques dans différents tissus de *C. gigas* transplantés dans différents sites de la côte Atlantique française, pendant trois mois, en hiver. ns: Corrélations non significatives ($p < 0,01$) ; nd : non déterminés ; SOD: superoxyde dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathion peroxydase; MDA: malondialdéhyde; nd: non déterminé.

		SOD	CAT	GPx	MDA	Catécholase	Laccase	Lysozyme
Branchies	SOD	1,00						
	CAT	ns	1,00					
	GPx	ns	-0,68	1,00				
	MDA	ns	ns	ns	1,00			
	Catécholase	ns	ns	ns	ns	1,00		
	Laccase	ns	ns	ns	ns	0,70	1,00	
	Lysozyme	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1,00
Glande digestive	SOD	1,00						
	CAT	ns	1,00					
	GPx	ns	-0,85	1,00				
	MDA	ns	ns	ns	1,00			
	Catécholase	ns	ns	ns	ns	1,00		
	Laccase	-0,77	ns	ns	-0,86	ns	1,00	
	Lysozyme	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1,00
Manteau	SOD	1,00						
	CAT	ns	1,00					
	GPx	ns	ns	1,00				
	Catécholase	ns	ns	ns	nd	1,00		
	Laccase	ns	ns	0,72	nd	ns	1,00	
	Lysozyme	ns	ns	ns	nd	ns	ns	1,00
Plasma	SOD	1,00						
	CAT	0,71	1,00					
	GPx	ns	ns	1,00				
	Catécholase	0,81	0,72	ns	nd	1,00		
	Laccase	ns	ns	ns	nd	ns	1,00	
	Lysozyme	ns	ns	ns	nd	ns	ns	1,00

Tableau 37 Résultats des tests de corrélation de rang de Spearman sur les réponses biologiques dans différents tissus de *C. gigas* transplantés dans différents sites de la côte Atlantique française, sur l'année, ns: Corrélations non significatives ($p < 0,01$) ; nd : non déterminé ; SOD: superoxyde dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathion peroxydase; MDA: malondialdéhyde.

		SOD	CAT	GPx	MDA	Catécholase	Laccase	Lysozyme
Branchies	SOD	1,00						
	CAT	ns	1,00					
	GPx	ns	ns	1,00				
	MDA	ns	ns	ns	1,00			
	Catécholase	ns	ns	ns	ns	1,00		
	Laccase	ns	ns	ns	ns	ns	1,00	
	Lysozyme	ns	0,49	ns	ns	ns	ns	1,00
Glande digestive	SOD	1,00						
	CAT	ns	1,00					
	GPx	ns	-0,65	1,00				
	MDA	ns	ns	ns	1,00			
	Catécholase	ns	ns	ns	ns	1,00		
	Laccase	ns	ns	ns	-0,60	ns	1,00	
	Lysozyme	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1,00
Manteau	SOD	1,00						
	CAT	ns	1,00					
	GPx	ns	ns	1,00				
	Catécholase	ns	ns	ns	nd	1,00		
	Laccase	ns	ns	ns	nd	ns	1,00	
	Lysozyme	ns	ns	ns	nd	ns	ns	1,00
Plasma	SOD	1,00						
	CAT	0,52	1,00					
	GPx	ns	ns	1,00				
	Catécholase	ns	ns	0,48	nd	1,00		
	Laccase	ns	ns	ns	nd	ns	1,00	
	Lysozyme	ns	ns	ns	nd	ns	ns	1,00

Discussion générale et conclusions



Source : <http://www.scienceblogs.com>

1. Rôle des phénoloxydases chez *C. gigas*

Le premier objectif de cette thèse a été 1) d'identifier les activités PO susceptibles d'être présentes dans différents tissus de l'huître, et 2) d'étudier leur implication dans les mécanismes de défense immunitaire, puis le second et le troisième objectifs ont consisté à évaluer le potentiel de ces activités comme biomarqueurs de stress environnemental 1) dans des conditions contrôlées de laboratoire et 2) sur le terrain.

Nous avons pu mettre en évidence :

- L'existence de deux activités de type PO, catécholase et laccase, dans différents tissus de *C. gigas* ;

- Que dans des conditions *in vitro* ces activités pouvaient participer à l'inhibition de la croissance de certaines souches pathogènes de *C. gigas* ;
- Que ces activités pouvaient être modulées lorsque les huîtres étaient exposées *in vivo* ou *in situ* à différents contaminants organiques.

Nous avons pu établir ainsi, dans certains cas, des corrélations entre la réponse des activités PO et :

- 1) La teneur en contaminants organiques dans les huîtres
- 2) Les enzymes antioxydantes SOD, CAT ou GPx
- 3) Les taux de MDA
- 4) Le lysozyme

Ces corrélations sembleraient indiquer que les PO pourraient jouer différents rôles dans les mécanismes de défense chez *C. gigas*.

Lorsqu'un contaminant rentre dans l'organisme, il peut :

- Générer un **stress**, provoquant une libération d'hormones et/ou de neurotransmetteurs, et notamment de catécholamines,
- Ou bien être perçu comme une molécule du **non-soi**, pouvant être reconnu par une PRP,
- Ou être reconnu comme un **xénobiotique**, provoquant une activation des systèmes de détoxification.

Ainsi, différentes hypothèses peuvent être émises en fonction de comment le contaminant est perçu par l'organisme et en comparant la réponse des PO avec d'autres réponses biologiques :

1) Tout d'abord, l'implication des PO dans les défenses cellulaire et humorale et dans la reconnaissance du non-soi chez les invertébrés (Söderhäll & Cerenius 1998, Cerenius *et al.* 2008), et, l'implication soupçonnée dans la résistance aux infections par des agents pathogènes chez les bivalves (Peters & Raftos 2003, Newton *et al.* 2004, Bezemer *et al.* 2006) suggèrent que les PO jouent un **rôle immunitaire** important lors de l'entrée de molécules étrangères dans l'hôte. La reconnaissance du contaminant par l'organisme comme une source de stress ou comme une molécule du non-soi provoquerait une activation de mécanismes de défense immunitaire. Ainsi, les PO pourraient alors être activées et/ou induites. De cette façon, la mesure de l'activité PO pourrait permettre de détecter une activation anormale du système de défense immunitaire. De plus, cette détection pourrait se faire de façon assez **précoce**, c'est-à-dire dès l'entrée du

contaminant dans l'organisme. L'utilisation des PO comme biomarqueur de stress environnemental permettrait donc de détecter une situation de stress avant que celle-ci ne provoque un impact grave sur l'organisme ;

2) Par ailleurs, la métabolisation des contaminants par les systèmes de détoxification peut conduire à une production importante de radicaux libres, provoquant par conséquent l'activation d'enzymes antioxydantes, pour le maintien de l'homéostasie au sein de l'organisme. De plus, du fait de ces propriétés oxydoréductrices, et en se basant sur les corrélations positives obtenues entre les activités PO et les activités CAT, GPx et SOD et/ou les teneurs en contaminants dans les huîtres, les PO pourraient jouer un **rôle antioxydant** chez *C. gigas*. Ainsi, les PO, à l'instar d'autres enzymes antioxydantes, pourraient être utilisées comme biomarqueurs d'exposition. Les propriétés antioxydantes ont été évoquées dans le passé chez d'autres êtres vivants (Lugasi 1997) mais aucune étude n'a été réalisée à notre connaissance chez les bivalves marins tels que *C. gigas* ;

3) Enfin, du fait de son affinité à différents types de substrats phénoliques et non phénoliques, les PO pourraient avoir une affinité pour différents contaminants organiques, et, de par ses propriétés oxydoréductrices, pourrait jouer un rôle également dans la métabolisation des contaminants. Certains auteurs se sont intéressés d'ailleurs aux propriétés de détoxification des PO, et plus particulièrement aux propriétés de détoxification des laccases aux phénols et aux hydrocarbures (Dodor *et al.* 2004). Ainsi, les corrélations positives observées dans le cadre de notre étude entre les activités PO et la teneur en contaminants chez *C. gigas* et entre les activités PO et du lysozyme pourraient correspondre à une implication de celles-ci dans les mécanismes de détoxification des contaminants organiques. Les PO pourraient jouer alors un **rôle détoxifiant** chez *C. gigas*, contribuant à la métabolisation des contaminants chimiques dans l'organisme, et dans ce cas pourraient être utilisées comme biomarqueurs d'effet.

2. Limitations à utiliser les phénoloxydases chez *Crassostrea gigas* comme biomarqueurs de stress environnemental

La limitation majeure à utiliser les PO comme biomarqueurs réside sur le fait qu'aucune étude *in vivo* ou *in situ* n'a été réalisée à notre connaissance chez *C. gigas* pour clarifier le rôle joué par les PO chez cet organisme.

En effet, les conséquences de la modulation des activités PO pourraient être assez variées. Si les PO jouent un rôle dans les mécanismes de défense immunitaire de *C. gigas*, l'augmentation et l'inhibition des activités PO pourrait conduire à long-terme à une immunostimulation ou à une immunodépression, respectivement. (**Figure 42**). Il est important de tenir en compte également que l'hôte peut tenter de restaurer ses fonctions immunitaires, ou bien, d'éliminer l'altération en utilisant des mécanismes compensatoires. Des déséquilibres plus importants peuvent alors avoir lieu, ayant pour conséquence une perte de la régulation immunitaire normale et de la tolérance du soi, pouvant conduire à des phénomènes d'apoptose, à des allergies, à un stress oxydant exacerbé, et à une augmentation de la sensibilité aux maladies infectieuses (**Figure 42** ; Colosio *et al.* 2005).

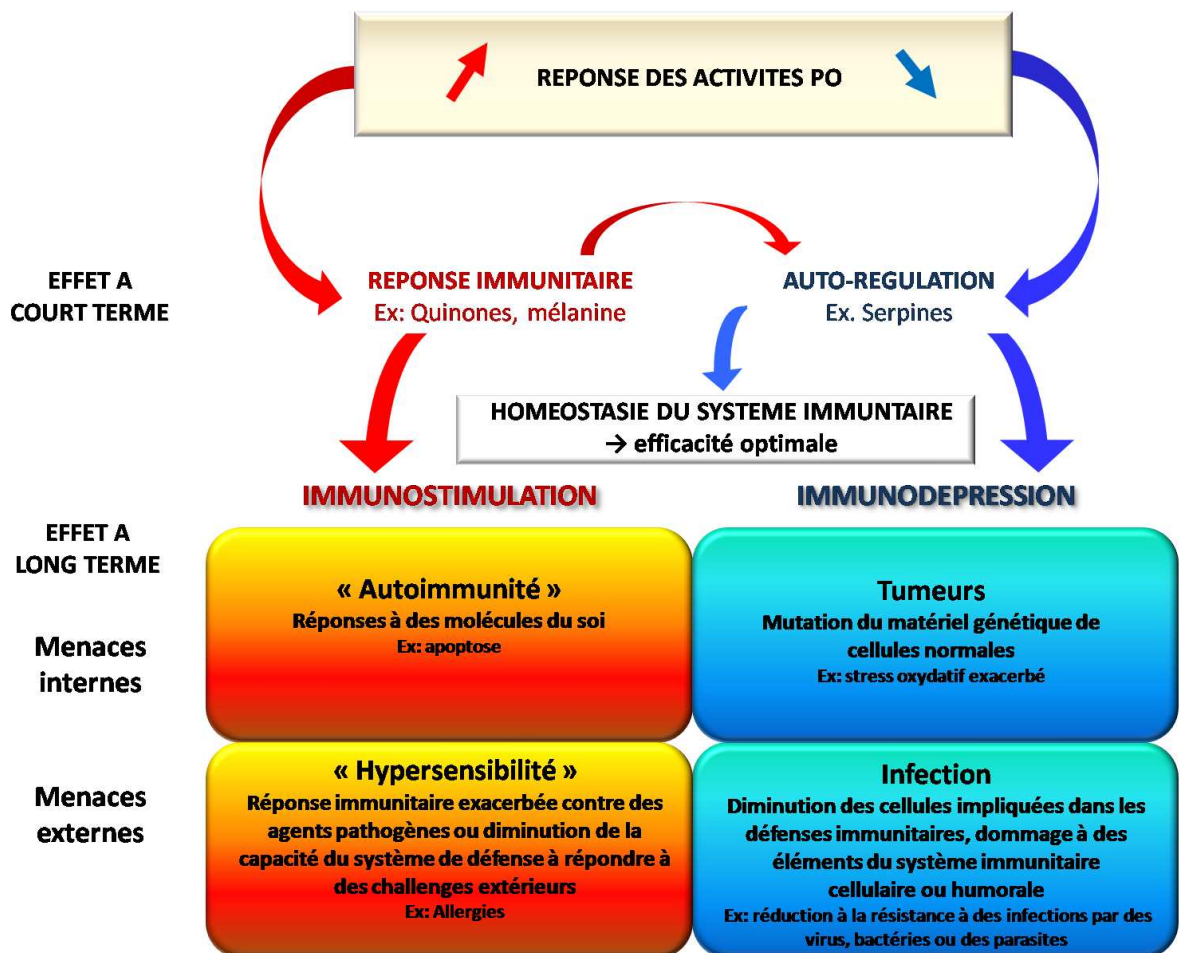


Figure 42 Conséquences possibles de la réponse des activités PO chez *Crassostrea gigas*.

Si les PO jouent un rôle antioxydant, l'inhibition de la PO pourrait mener à l'émergence d'effets génotoxiques (Nappi & Vass 2001). Ainsi, l'activation des PO pourrait assurer une protection aux cellules en limitant l'exposition aux xénobiotiques ou en limitant l'émergence de leurs effets.

Puis, si les PO jouent un rôle dans la détoxification des contaminants, une inhibition de ces activités enzymatiques pourrait affecter la métabolisation des contaminants favorisant leur élimination. Puis, une suractivation de cette activité PO par la présence des contaminants pourrait conduire à une surproduction de quinones toxiques qui généreraient un stress oxydant.

Cependant, nous ne pouvons pas dire actuellement si une modulation des activités PO chez *C. gigas* pourrait conduire à l'ensemble de tous ces *scenarii* ou juste à un seul. De plus, nous ne sommes pas en mesure de dire à quel point la modulation des activités PO observée serait en dehors des limites de l'homéostasie. Ainsi, ce manque d'informations rendent difficile l'interprétation des résultats obtenus dans notre étude à une échelle biologique supérieure.

3. Avantages à utiliser les phénoloxydases chez *Crassostrea gigas* comme biomarqueurs de stress environnemental

Malgré les limitations évoquées précédemment, les études sur les effets des contaminants sur les activités PO sembleraient être de grand intérêt pour différentes raisons.

Tout d'abord, il est important d'évoquer que, les PO, ainsi que d'autres enzymes impliquées dans les mécanismes de défense, ne devraient pas être considérées seulement comme des biomarqueurs potentiels de contamination mais plutôt comme des marqueurs généralistes, qui mettent en évidence l'exposition à un stress environnemental global. En effet, une large gamme de facteurs extrinsèques et intrinsèques à l'organisme peut moduler les mécanismes de défense immunitaire. L'activité PO peut être modulée, par exemple, par des paramètres physico-chimiques tels que la température, la salinité, le taux d'ammoniac ou d'oxygène dissous (cf. **Tableau 31, Chapitre 3**) ou par des facteurs biologiques externes tels que la présence de bactéries, de parasites, de dinoflagellés

produisant des toxines, de nourriture, ou par des facteurs biologiques internes tels que la modulation des taux d'hormones comme les catécholamines (cf. **Tableau 31, Chapitre 3**).

De plus, dans les expériences que nous avons mené chez *C. gigas*, et en accord avec d'autres études, différents types de contaminants tels que les herbicides, les HAP, les PCB, les PBDE et les OCP sembleraient être susceptibles de moduler les activités PO, et notamment, dans le cadre de notre étude, au niveau de deux tissus : l'hémolymphe et les branchies. Ainsi, l'utilisation des PO comme biomarqueur de stress environnemental dans différents compartiments hémolympatiques et tissus de *C. gigas*, et plus particulièrement dans le plasma et les branchies, offrirait une vision intégrée de l'effet des contaminants sur des organismes exposés à différentes sources de stress.

Enfin, les PO sembleraient jouer trois rôles majeurs 1) un rôle immunitaire, 2) un rôle antioxydant et 3) un rôle détoxifiant. Malgré le fait que nous les avons présentés dans un premier temps comme des rôles séparés, les PO pourraient jouer ces trois rôles en même temps chez l'organisme. En effet, ces rôles seraient joués par les PO en fonction de comment le contaminant est perçu par l'organisme, c'est-à-dire s'il provoque un stress ou s'il est perçu comme une molécule du non-soi ou bien comme un xénobiotique, comme nous le proposons dans le schéma de synthèse de la **Figure 43**. Ainsi, le contaminant, en fonction de ses caractéristiques et de la dose à laquelle il serait présent dans le milieu, serait susceptible de moduler le mode d'action et le rôle joué par les PO dans l'organisme, ce qui pourrait avoir des conséquences non seulement au niveau des mécanismes de défense immunitaire mais également au niveau d'autres mécanismes tels que ceux de protection contre le stress oxydant ou de détoxification des contaminants. De ce fait, l'utilisation des PO comme biomarqueur en réponse à une exposition à des contaminants chimiques permettrait d'évaluer les effets de ces contaminants non seulement sur les mécanismes de défense immunitaire mais également sur d'autres processus biologiques indispensables au maintien de l'homéostasie de l'organisme.

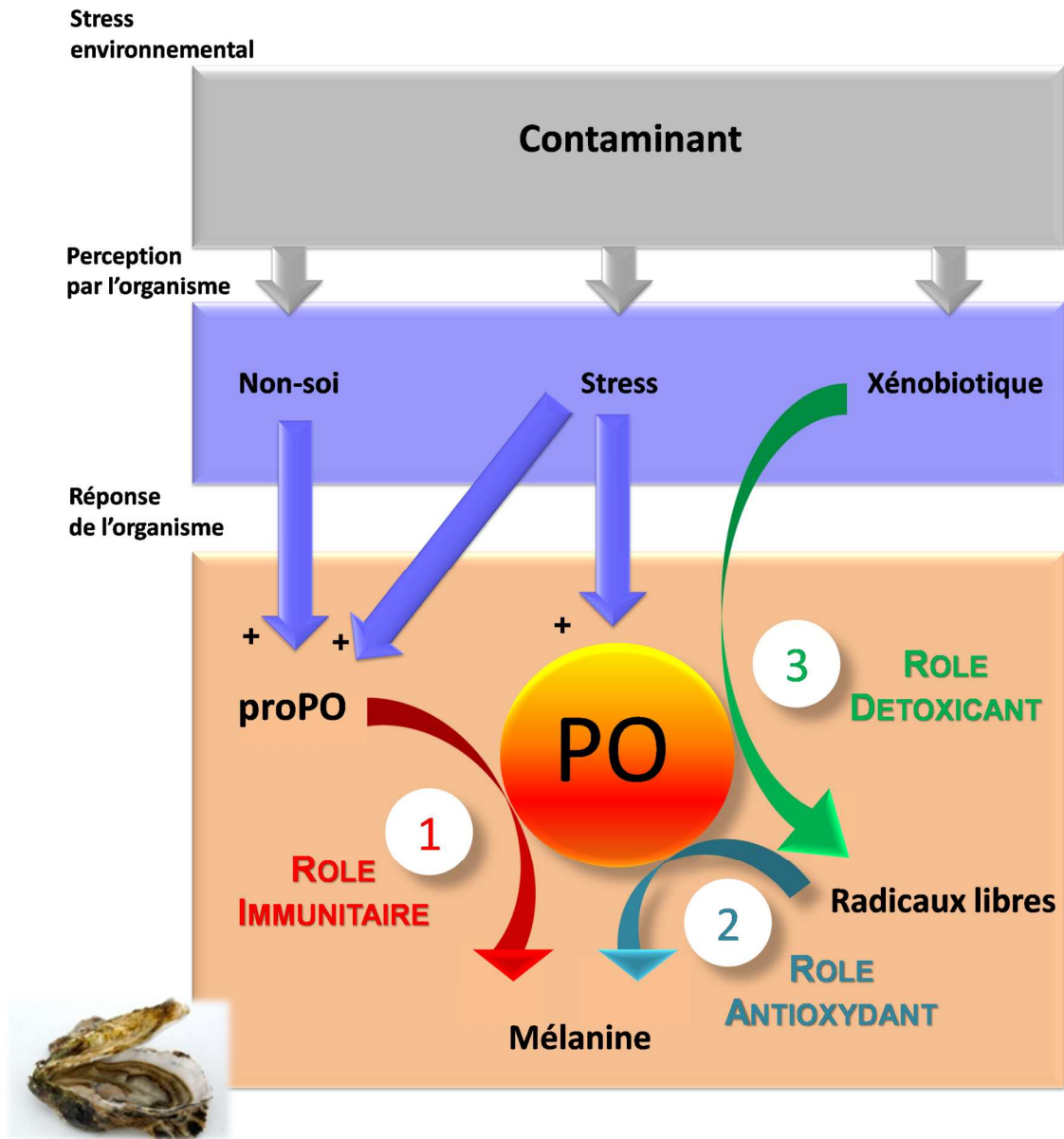


Figure 43 Rôles potentiels des PO chez *Crassostrea gigas*. Les contaminants présents dans le milieu peuvent provoquer un stress et/ou être perçus par l'organisme des molécules du non-soi, et/ou comme des xénobiotiques. Ainsi, l'huître mettra en place différents mécanismes de défense pour assurer le maintien de son homéostasie. Dans ce contexte, les PO pourraient jouer un rôle immunitaire, un rôle antioxydant ou bien un rôle détoxifiant.

Perspectives



Source : <http://www.scienceblogs.com>

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux PO chez *C. gigas* et à leur potentiel comme biomarqueur de stress environnemental. Les résultats que nous avons obtenus soulèvent des questions variées sur les interactions entre différents acteurs de la triade hôte – pathogène – environnement, à savoir :

1. Y a-t-il une relation entre la réduction des activités PO et la réduction de l'immunité ?

La présence des PO au niveau de toute l'échelle phylogénétique suggère une grande importance fonctionnelle de ce type d'enzymes. Ainsi, pour une meilleure compréhension du potentiel à utiliser les PO comme biomarqueurs pertinents de stress environnemental, il ressort de toute évidence que, d'un point de vue fondamental, des études sur le **rôle physiologique des PO chez *C. gigas*** permettraient de mieux comprendre l'importance de ces enzymes dans l'immunité et le maintien de l'homéostasie de cet organisme.

Elargir les études sur l'implication des activités PO dans les mécanismes de défense immunitaire à d'autres souches bactériennes ou virales

En effet, nous avons étudié le rôle potentiel des PO dans les mécanismes de défense immunitaire chez *C. gigas*, et nous avons vu que les activités PO, notamment au niveau des hémocytes, interviendraient dans des processus antibactériens contre des souches bactériennes. Du fait que les effets ont été observés contre des souches pathogènes de l'huître, une plus ample investigation sur l'effet antibactérien des PO pourrait être de grand intérêt dans la compréhension des interactions hôte-pathogène. Le type d'approche que nous avons employé pourrait être utilisé également sur d'autres souches bactériennes ou virales.

De plus, nous avons travaillé sur des échantillons broyés mais des études sur des cultures cellulaires permettraient en plus d'intégrer les interactions ayant lieu éventuellement entre différentes cellules au moment de l'activation de mécanismes de défense.

Puis, des études d'infection *in vivo* pourraient être réalisées entre des lignées possédant différents niveaux d'activité PO de façon à pouvoir mettre en relation la présence de ces activités et la résistance à des infections et/ou à des maladies infectieuses.

Déterminer quelles sont les valeurs de PO pour un individu sain et un individu malade

Dans le but de pouvoir interpréter les résultats obtenus sur la modulation des activités PO à une échelle biologique supérieure à celle de la protéine, il serait intéressant de recueillir **des valeurs de témoins positifs**, c'est-à-dire des valeurs d'activité PO sur des animaux malades, permettant d'établir des relations entre la présence d'agents pathogènes, les niveaux d'infection, l'apparition de la maladie et la réponse de l'activité PO. Dans le cas de *S. glomerata*, par exemple, une corrélation a pu être établie entre l'activité PO et l'infection par le parasite responsable de la maladie QX (Peters & Raftos 2003, Newton *et al.* 2004, Bezemer *et al.* 2006). L'idéal serait alors de pouvoir établir des **relations niveaux de PO - effets**, puis connaître également la fourchette de valeurs correspondant à un stade « normal » de l'animal, par rapport à un stade pathologique. Tel est le cas pour certains paramètres moléculaires, biochimiques et cellulaires étudiés chez l'Homme, les animaux domestiques ou d'élevage.

Identifier les protéines responsables des activités PO chez C. gigas

De plus, malgré le fait d'avoir identifié différents types d'activité PO, nous ne sommes pas dans la mesure de dire si ces activités correspondent à la présence d'une seule protéine

possédant deux types d'activité, ou bien s'il s'agit de différentes protéines. La poursuite sur la purification de ces protéines, en réalisant éventuellement en parallèle une étude zymographique et par spectrométrie de masse, permettrait d'**identifier les protéines responsables des activités PO** chez *C. gigas*. De plus, la détermination de la séquence protéique de ces protéines, pourrait être utilisée, par exemple, pour fabriquer des anticorps dirigés contre ces protéines et permettre alors de développer des tests plus précis tels que les **tests ELISA**.

Etudier la variabilité interindividuelle

D'autre part, dans le cadre de notre étude, les analyses ont été réalisées avec des échantillons poolés. L'utilisation d'échantillons poolés offre une quantité suffisante de matériel permettant de réaliser des analyses multiples avec un même groupe d'animaux (Gagnaire 2005) et permet de diminuer la variabilité biologique. Nous avons pu ainsi mettre en évidence des corrélations entre la réponse de différentes activités enzymatiques impliquées dans les mécanismes de défense chez *C. gigas*. En effet, la réalisation d'analyses individu par individu implique la récupération d'une faible quantité en échantillon, notamment en hémolymphe, et donc une limitation quant au nombre de paramètres pouvant être analysés sur un échantillon de même provenance (dans ce cas, d'un même individu). Néanmoins, suite aux résultats obtenus au cours de cette thèse, des **analyses individuelles** permettraient de mieux appréhender la variabilité interindividuelle existant au sein de la population, et pourraient être utilisées, par exemple, pour la sélection de souches résistantes (Auffret & Oubella 1997). Ce type d'analyse permettrait également d'évaluer les conséquences éventuelles de la modulation des activités PO non seulement sur les performances physiologiques, mais également sur les performances écologiques de cet organisme (Auffret & Oubella 1997).

2. Y a-t-il une relation entre la réduction de l'immunité, et donc de l'apparition des mortalités estivales, et les contaminants ?

Lier effets des contaminants sur la réduction de l'immunité et notamment des activités PO avec l'apparition des mortalités estivales

Un suivi *in situ* de la teneur en contaminants, de la teneur en agents pathogènes, du pourcentage de mortalités et des taux d'activité PO permettrait

d'établir d'éventuelles corrélations entre des acteurs de la triade hôte - agent pathogène - environnement dans le contexte des mortalités estivales.

Dans les études qui utiliseraient les PO comme biomarqueurs de stress environnemental, une approche :

- multimarqueur (en étudiant différents biomarqueurs 1) d'exposition, 2) de défense et de 3) de dommage aux contaminants),
- multi-tissus (incluant notamment l'hémolymphe et les branchies),
- à différents niveaux d'organisation biologique (moléculaire, cellulaire, tissulaire, physiologique),

permettrait de réaliser un diagnostic pertinent des effets des **contaminants** sur la modulation des **activités PO** et les conséquences éventuelles sur les **capacités de défense immunitaire** de l'animal (Lagadic *et al.* 1997). Ces analyses pourraient être complétées en mesurant les contenus en contaminants dans l'eau de mer, dans le sédiment et dans l'organisme, dans le but d'apporter des précisions sur les sources potentielles de stress et des effets prévisibles.

Le suivi d'autres paramètres tels que le statut reproducteur de l'animal, la qualité et la quantité de nourriture présente dans le milieu, la température et la salinité, entre autres, permettrait de mieux appréhender d'autres causes de modulation des activités PO.

De plus, les PO sont des protéines ubiquitaires donc les études réalisées sur *C. gigas*, pourraient être développées également chez **d'autres espèces**. Il semblerait essentiel ainsi de savoir, pour chaque espèce, ou population d'espèces sentinelles, **les niveaux maximums et les seuils** qui feraient basculer l'organisme d'une situation de défense à une situation d'émergence d'effets délétères. Les niveaux maximums pourraient être établis en utilisant des contaminants qui induisent une réponse positive importante (immunosuppression) ou bien des infections par des agents pathogènes qui induisent une immunostimulation élevée.

Des **modèles de simulation** de l'effet d'un facteur de stress tel qu'un contaminant pourraient également être développés, à l'aide de l'ensemble de données collectées (Moore *et al.* 2004a).

Déterminer à quel niveau l'activation du système proPO peut être affectée

Il serait intéressant d'approfondir les recherches sur l'activation des proPO en PO chez *C. gigas* en réalisant une analyse avec un nombre plus important d'activateurs ou des

concentrations moins importantes que celles que nous avons utilisé. En effet, les modulations des activités PO observées dans le cadre de cette étude pourraient être dues à une interaction directe entre les contaminants et les PO, mais pourraient être dues également à une interaction en amont entre les contaminants et le système d'activation de la proPO. Ainsi, des **études comparatives sur les effets des contaminants sur les activités PO endogènes et stimulées** pourraient être réalisées, dans le but de déterminer à quel niveau le système proPO serait affecté.

Poursuivre les recherches à l'échelle moléculaire et biochimique des effets des contaminants sur les PO

A l'échelle moléculaire, la **caractérisation de nouveaux gènes** codant pour les PO, pourrait être utile pour réaliser des suivis de la qualité de l'environnement *via* la réalisation de **puces à ADN** (Robbens *et al.* 2007). A l'échelle biochimique, une meilleure connaissance des structures des PO, une meilleure connaissance des substrats et/ou d'inhibiteurs potentiels et de leur interaction avec les PO permettrait aussi de mieux comprendre les mécanismes **d'inhibition ou d'activation des PO, notamment par certains contaminants**, ayant des structures proches aux substrats, aux activateurs ou aux inhibiteurs des PO.

3. Quels contaminants sont susceptibles de réduire cette immunité ?

Contaminants individuels et en mélange

Le manque de connaissances sur les effets des substances pharmaceutiques sur *C. gigas* montre qu'il reste encore de nombreuses inconnues quant à l'effet d'un nombre important de contaminants présents dans les zones côtières et estuariennes. Ainsi, des études avec des **mélanges** contenant un nombre plus importants de contaminants pourraient être réalisées. Ces mélanges pourraient être faits entre des contaminants ayant des propriétés très différentes comme les pesticides et les substances pharmaceutiques ou bien appartenant à une même classe de contaminants (un mélange, par exemple, de plusieurs pharmaceutiques). Néanmoins l'utilisation de mélanges ne permet pas de dire si c'est un seul contaminant qui provoque l'effet observé ou pas. Ainsi, les études avec des mélanges qui donneraient des résultats positifs, pourraient être accompagnées par des études sur les contaminants de façon individuelle.

Produits de dégradation

Des études également sur les **produits de dégradation ou de métabolisation** en comparaison aux molécules mères ou bien du produit utilisé en agriculture par rapport au principe actif testé en laboratoire pourraient être réalisées. Ce type d'étude permettrait d'évaluer l'effet d'autres composants pouvant être présents en même temps, et être potentiellement plus nocifs, que la molécule mère ou le principe actif testé.

Autres contaminants organiques ou contaminants inorganiques

De plus, nous avons travaillé sur des contaminants organiques mais d'autres contaminants tels que des biocides comme le TBT et le CuSO_4 ou les métaux comme le Cd, présents aussi dans les zones côtières et estuariennes, moduleraient l'activité PO chez les bivalves marins (Hellio *et al.* 2000 ; Gagnaire *et al.* 2003).

Ainsi, des études avec **d'autres contaminants tels que les métaux ou les biocides présents dans les peintures anti-fouling** permettraient d'avoir une vision plus large sur les effets des contaminants potentiellement présents dans le milieu sur les activités PO et sur d'autres paramètres impliqués dans les mécanismes de défense chez *C. gigas*.

Perturbateurs endocriniens

Certaines études sur les PO chez les bivalves ont montré également que des taux élevés en hormones et neurotransmetteurs comme les catécholamines pouvaient moduler l'activité PO chez *C. gigas* (cf. **Tableau 31, Chapitre 3**). Ainsi, il serait intéressant d'approfondir nos connaissances sur les effets des **perturbateurs endocriniens** sur les niveaux de catécholamines chez *C. gigas* et par conséquent sur les capacités de défense de cet organisme.

Pour finir, les principaux résultats, conclusions et perspectives de cette thèse sont présentés sous la forme d'un bilan synthétique sur la **Figure 44**.

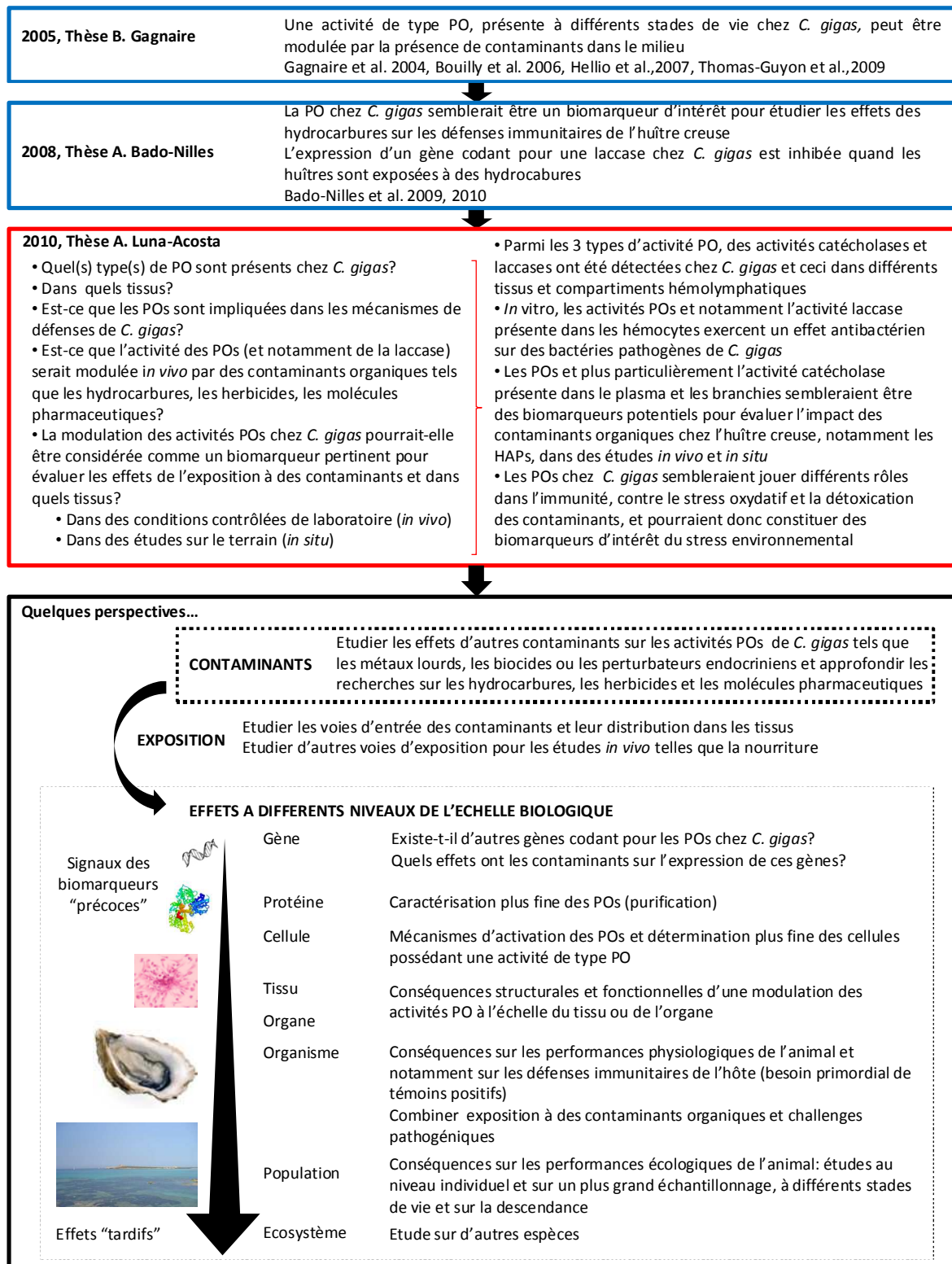


Figure 44 Bilan de la thèse : hypothèses de départ, principaux résultats, perspectives.

Références bibliographiques

- Aladaileh S, Rodney P, Nair S, Raftos D (2007a) Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Comparative Biochemistry & Physiology B* 148:470-480
- Aladaileh S, Nair S, Raftos D (2007b) Induction of phenoloxidase and other immunological activities in Sydney rock oysters challenged with microbial pathogen-associate molecular patterns. *Fish & Shellfish Immunology* 23:1196-1208
- Aladaileh S, Nair S, Raftos D (2008) Effects of noradrenaline on immunological activity in Sydney rock oysters. *Developmental & Comparative Immunology* 32:627-636
- Alan R, Ezekowitz B, Hoffmann J (1998) Innate immunity: The blossoming of innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10:9-11
- Amiard J, Amiard-Triquet C (2008) Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier, Paris, p 372
- Arias M, Arenas M, Rodriguez J, Soliveri J, Ball A, Hernandez M (2003) Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenol substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1953-1958
- Arumugan M, Romestand B, Torreilles J (2000) Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquatic Living Resources* 13:173-177
- Asada N, Fukumitsu T, Fujimoto K, Masuda K (1993) Activation of prophenoloxidase with 2-propanol and other organic compounds in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry & Molecular Biology* 23:515-520
- Asokan R, Arumugam M, Mullainadhan P (1997) Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Developmental & Comparative Immunology* 21:1-12
- Auffret M, Oubella R (1994) Cytometric parameters of bivalve molluscs: effect of environmental factors. In: Stolen J FT (ed) *Modulators of fish immune responses*. SOS Publications, Fair Haven, p 23-32
- Auffret M, Oubella R (1997) Haemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *In vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comparative Biochemistry & Physiology A* 118:705-712
- Auffret M (2003) *An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs*. Editions Quae, Versailles, p 201
- Babior B (1984) Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 64:959-966
- Bachère E, Chagot D, Grizel H (1988) Separation of hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Developmental & Comparative Immunology* 12:549-559

- Bachère E, Hervio D, Mialhe E, Grizel H (1990) Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. *Developmental & Comparative Immunology* 14:261-268
- Bachère E, Gueguen Y, González M, de Lorgeril J, Garnier J, Romestand B (2004) Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews* 198:149-168
- Badano E, Cavieres L (2006) Ecosystem engineering across ecosystems: do engineer species sharing common features have generalized or idiosyncratic effects on species diversity? *33:304-313*
- Bado-Nilles A (2008) Effets de pollutions par hydrocarbures sur les capacités de défense d'organismes marins. Université de La Rochelle, p 266
- Bado-Nilles A, Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Le Floch S, Renault T (2008) Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicology in Vitro* 22:1610-1617
- Bado-Nilles A, Quentel C, Auffret M, Le Floch S, Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H (2009) Immune effects of HFO on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 72:1446-1454
- Bado-Nilles A, Renault T, Faury N, Le Floch S, Quentel C, Auffret M, Thomas-Guyon H (2010) *In vivo* effects of LCO soluble fraction on immune-related functions and gene transcription in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* 97:196-203
- Bai G, Brown J, Watson C, Yoshine T (1997) Isolation and characterization of phenoloxidase from egg masses of the gastropod mollusc, *Biomphalaria glabrata*. *Comparative Biochemistry & Physiology B* 118:463-469
- Bailey K, Worboys B (1960) The lamellibranch crystalline style. *Biochemical Journal* 76:487-491
- Baldrian P, Gabriel J (2002) Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. Blackwell Publishing Ltd, p 69-74
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P (1998) Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean sea. Wiley Periodicals, Inc., p 765-776
- Barnhart R (1969) Effects of certain variables on hematological characteristics of rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society*. 98:411-418
- Bayne B, Moore M, Widdows J, Livingstone D, Salkeld P, Crisp D, Morris R, Gray J, Holden A, Newell R, McIntyre A (1979) Measurement of the responses of individuals to environmental stress and pollution: Studies with bivalve molluscs [and discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 286:563-581
- Bayne C (1990) Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. In: *Comparative Immunology*. University of California Press, Berkeley, p 723-731
- Bertrand G (1896) Simultaneous occurrence of laccase and tyrosinase in the juice of some mushrooms. *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences* 123:463-465

- Bezemer B, Butt D, Nell J, Adlard R, Raftos D (2006) Breeding for QX disease resistance negatively selects one form of the defense enzyme, phenoloxidase, in Sydney rock oysters. *Fish & Shellfish Immunology* 20:627-636
- Bharathi N, Ramalingam K (1983) Electrophoretic study of the enzyme phenoloxidase from the enzyme gland in the foot of *Perna viridis* Linnaeus. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology* 70:123-128
- Bocquené G, Roig A, Fournier D (1997) Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*): Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. *FEBS Letters* 407:261-266
- Borrego J, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, Garcia M, 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
- Bouilly K, Gagnaire B, Bonnard M, Thomas-Guyon H, Renault T, Miramand P, Lapegue S (2006) Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology* 78:149-156
- Bouilly K, Bonnard M, Gagnaire B, Renault T, Lapegue S (2007) Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52:58-63
- Boutet I, Tanguy A, Rousseau S, Auffret M, Moraga D (2003) Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperones* 8:76-85
- Boutet I, Tanguy A, Moraga D (2004) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329:147-157
- Brennan C, Anderson K (2004) *Drosophila*: The genetics of innate immune recognition and response. *Annual Review of Immunology* 22:457-483
- Buisson S, Bouchart V, Guerlet E, Malas J, Costil K (2008) Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in shellfish production area in Normandy. *Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes* 43:655-664
- Butt D, Shaddick K, Raftos D (2006) The effect of low salinity on phenoloxidase activity in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Aquaculture* 251:159-166
- Butt D, Aladaileh S, O'Connor W, Raftos D (2007) Effect of starvation on biological factors related to immunological defence in the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture* 264:82-91
- Butt D, O'Connor S, Kuchel R, O'Connor W, Raftos D (2008) Effects of the muscle relaxant, magnesium chloride, on the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture* 275:342-346
- Byrne P, O'Halloran J (2001) The role of bivalve molluscs as tools in estuarine sediment toxicity testing: A review. *Hydrobiologia* 465:209-217
- Cajaraville M, Bebianno M, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *The Science of The Total Environment* 247:295-311

- Canesi L, Ciacci C, Betti M, Scarpato A, Citterio B, Pruzzo C, Gallo G (2003) Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Aquatic Toxicology* 63:293-306
- Canevari G (1973) Development of the 'next generation' chemical dispersants. Prevention and control of oil spills, Washington DC, p 231-240
- Canevari G (1978) Some observations on the mechanism and chemistry aspects of chemical dispersion. *American Society for Testing and Materials* 659:5-17
- Cardenas W, Dankert J (2000) Cresolase, catecholase and laccase activities in haemocytes of the red swamp crayfish. *Fish & Shellfish Immunology* 10:33-46
- Cazenave J, Bistoni M, Zwirnmann E, Wunderlin D, Wiegand C (2006) Attenuating effects of natural organic matter on microcystin toxicity in zebra fish (*Danio rerio*) embryos - Benefits and costs of microcystin detoxication. *Environmental Toxicology* 21:22-32
- Cerenius L, Lee B, Söderhäll K (2008) The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology* 29
- Clark R (2001) *Marine Pollution*. Oxford University Press, New York, p 238
- Claus H (2003) Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology* 179:145-150
- Claus H, Decker H (2006) Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology* 29:3-14
- Coles J, Pipe R (1994) Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Fish & Shellfish Immunology* 4:337-352
- Colosio C, Birindelli S, Corsini E, Galli C, Maroni M (2005) Low level exposure to chemicals and immune system. *Toxicology & Applied Pharmacology* 207:320-328
- Cong R, Suna W, Liub G, Fana T, Menga X, Yanga L, Zhub L (2005) Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish & Shellfish Immunology* 18:61-70
- Coon S, Bonar D, Weiner R (1985) Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), by L-DOPA and catecholamines. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology* 94:211-221
- Cooreman K, Roose P, Vyncke W (1993) Screening of organophosphate and carbamate pesticides by cholinesterase inhibition, ICES Marine Environmental Quality Committee
- Chakraborty S, Ray M, Ray S (2010) Toxicity of sodium arsenite in the gill of an economically important mollusc of India. *Fish & Shellfish Immunology* 29:136-148
- Chang C-C, Lee P-P, Liu CH, Cheng W (2006) Trichlorfon, an organophosphorus insecticide, depresses the immune responses and resistance to *Lactococcus garvieae* of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology* 20:574-585
- Cheney D, MacDonald B, Elston R (2000) Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington. *Journal of Shellfish Research* 19:353-359
- Cheng T (1981) Bivalves. In: Ratcliffe NA, Rowley A (eds) *Invertebrate blood cells*. Academic Press, London, p 233-300

- Cheng T (1996) Hemocytes: Forms and functions. In: Kennedy V, Newell R, Eble F, Newell R, Eble F (eds) *The eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, College Park, p 299–333
- Cheng W, Chen J-C (2000) Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology* 10:387-391
- Choi Y, Jo P, Choi C (2008) Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 147:286-292
- Dawley R, Flurkey W (1993) Differentiation of tyrosinase and laccase using 4-hexyl-resorcinol, a tyrosinase inhibitor. *Phytochemistry* 33:281-284
- De Decker S (2010) Approches multifactorielles pour l'étude d'interactions entre l'huître creuse *Crassostrea gigas* et deux *Vibrio* pathogènes, *V. splendidus* et *V. aestuarianus* : épidémiologie, variabilité de la sensibilité de l'hôte et pathogénèse. Université de La Rochelle, p 388
- De Decker S, Normand J, Saulnier D, Pernet F, Castagnet S, Boudry P (In Press) Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* infection in relation to their reproductive status. *Journal of Invertebrate Pathology* In Press, Corrected Proof
- De Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan H (2000) Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* 50:51-71
- De Lange H, Noordoven W, Murk A, Lürling M, Peeters E (2006) Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 78:209-216
- Decker H, Terwillinger N (2000) Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology* 203:1777–1782
- Decker H, Schweikardt T, Nillius D, Salzbrunn U, Jaenicke E, Tucek F (2007) Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene* 398:183-191
- Depledge M (1993) The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Fossi M, Leonzio C (eds) *Non-destructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, p 261-285
- Di Giulio R, Washburn P, Wenning R, Winston G, Jewell C (1989) Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology & Chemistry* 8:1103-1123
- Dicko M, Hilhorst R, Gruppen H, Laane C, van Berkel W, Voragen A (2002) Zymography of monophenolase and o-diphenoloxidase activities of polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry* 306:336-339
- Dimopoulos G (2003) Insect immunity and its implication in mosquito–malaria interactions. *Cellular Microbiology* 5:3-14
- Dodge A (1989) Herbicides interacting with photosystem II. In: *Herbicides & plant metabolism*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p 277

- Dodor D, Hwang H-M, Ekunwe S (2004) Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme & Microbial Technology* 35:210-217
- Duchemin MB, Fournier M, Auffret M (2007) Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 264:73-81
- Dyrynda E, Pipe R, Burt G, Ratcliffe N (1998) Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. *Aquatic Toxicology* 42:169-185
- Eastmond D, Smith M, Ruzo L, Ross D (1986) Metabolic activation of phenol by human myeloperoxidase and horseradish peroxidase. *Molecular Pharmacology* 30:674-679
- Eble A, Kennedy V, Newell R (1996) The eastern oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, College Park, MD, USA, p 734
- Elston R (1993) Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Annual Review of Fish Diseases* 3:259-276
- Elston R, Hasegawa H, Humphrey K, Polyak I (2008) Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: Severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Diseases of Aquatic Organisms* 82:119-134
- Ericson H, Thorsén G, Kumblad L (2010) Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquatic Toxicology* 99:223-231
- Espín J, Veltman R, Wichers H (2000) The oxidation of L-ascorbic acid catalysed by pear tyrosinase. *Physiologia Plantarum* 109:1-6
- Faisal M, MacIntyre E, Adham K, Tall B, Kothary M, La Peyre J (1998) Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comparative Biochemistry & Physiology B* 121:161-168
- Fan T, Li M, Wang J, Yang L, Cong R (2009) Purification and characterization of phenoloxidase from *Octopus ocellatus*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 41:865-872
- FAO (2010) Aquaculture Production: Quantities 1950-2008, Rome. <http://www.fao.org>.
- Faure D, Bouillant M, Bally R (1995) Comparative study of substrates and inhibitors of *Azospirillum lipoferum* and *Pyricularia oryzae* laccases. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1144-1146
- Feng S (1988) Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. In: Fisher W (ed) Disease processes in marine bivalve molluscs. American Fisheries Society Special Publication, p 153–168
- Fisher W, Wishkovsky A, Chu F (1990) Effects of tributyltin on defense-related activities of oyster hemocytes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19:354-360
- Fisher W, Oliver L, Winstead J, Long E (2000) A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquatic Toxicology* 51:115-138

- Fisher W, Oliver L, Winstead J, Volety A (2003) Stimulation of defense factors for oysters deployed to contaminated sites in Pensacola Bay, Florida. *Aquatic Toxicology* 64:375-391
- Flurkey A, Cooksey J, Reddy A, Spoonmore K, Rescigno A, Inlow J, Flurkey W (2008) Enzyme, protein, carbohydrate, and phenolic contaminants in commercial tyrosinase preparations: potential problems affecting tyrosinase activity and inhibition studies. *Journal of Agriculture & Food Chemistry* 56:4760-4768
- Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H (2002) *In vitro* and *in vivo* effects of mercury on haemocytes of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg): development of techniques evaluating estuarine pollution. Congrès International de Limnologie-Océanographie, Paris
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T (2004) *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 16:501-512
- Gagnaire B (2005) Etude des effets des polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Université de La Rochelle, p 412
- Gagnaire B, Gay M, Huvet A, Daniel J, Saulnier D, Renault T (2007) Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *In vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* 84:92-102
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeot T, Renault T (2006) Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology* 22:1-14
- Gagné F, Blaise C, Andre C, Salazar M (2006) Effects of pharmaceutical products and municipal wastewaters on temperature-dependent mitochondrial electron transport activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 143:388-393
- Galloway T, Depledge M (2001) Immunotoxicity in invertebrates: Measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology* 10:5-23
- Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert M, Nicolas JL (2007) Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology* 53:187-196
- Gay M, Renault T, Pons A, Le Roux F (2004) Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Disease of Aquatic Organisms* 62:65-74
- Geffard A, Amiard JC, Amiard-Triquet C (2002) Kinetics of metal elimination in oysters from a contaminated estuary. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 131:281-293
- Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan J, Chaudiere J (1998) Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology* 11:1176-1183

- Germann U, Müller G, Hunziker P, Lerch K (1988) Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. Amino- and carboxyl-terminal processing of a precursor. *The Journal of Biological Chemistry* 263:885-896
- Gollas-Galván T, Sotelo-Mundo RR, Yepiz-Plascencia G, Vargas-Requena C, Vargas-Albores F (2003) Purification and characterization of [alpha]2-macroglobulin from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry & Physiology C* 134:431-438
- Gomez-Jimenez S, Uglow R, Gollas-Galvan T (2000) The effects of cooling and emersion on total haemocyte count and phenoloxidase activity of the spiny lobster *Panulirus interruptus*. *Fish & Shellfish Immunology* 10:631-635
- Gonzalez M (2005) Etude de la réponse immunitaire chez l'huître *Crassostrea gigas* : caractérisation et fonctions de protéines de reconnaissance aux LPS et d'effecteurs antimicrobiens. Université Montpellier II, p 157
- Gopalakrishnan S, Thilagam H, Huang W-B, Wang K-J (2009) Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo(a)pyrene. *Chemosphere* 75:389-397
- Gordon J, Carriker M (1980) Sclerotized protein in the shell matrix of a bivalve mollusc. *Marine Biology* 57:251-260
- Gouletquer P, Soletchnik P, Le Moine O, Razet D, Geairon P, Faury N (1998) Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France). Council Meeting of the International Council for the Exploration of the Sea, Cascais
- Gueguen Y, Cadoret J, Flament D, Barreau-Roumiguier C, Girardot A-L, Garnier J, Hoearreau A, Bachère E, Escoubas J (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303:139-145
- Gunata Y, Sapis J-C, Moutounet M (1987) Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenol oxidases. *Phytochemistry* 26:1573-1575
- Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, Gueguen M, Moal J, Palacios E, Lassus P, Soudant P (2010) Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology* 97:96-108
- Hada H, West P, Lee J, Stemmler J, Colwell R (1984) *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34:1-4
- Hauton C, Hawkins L, Williams J (1997) *In situ* variability in phenoloxidase activity in the shore crab, *Carcinus maenas* (L.). *Comparative Biochemistry & Physiology B* 117:267-271
- Hellio C, Bourgougnon N, Le Gal Y (2000) Phenoloxidase (E.C. 1.14.18.1) from *Mytilus edulis* byssus gland: purification, partial characterization and application for screening products with potential antifouling activities. *Biofouling* 16:235-244
- Hellio C, Bado-Nilles A, Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H (2007) Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a proPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish & Shellfish Immunology* 22:433-440

- Hernroth B, Baden S, Holm K, André T, Söderhäll I (2004) Manganese induced immune suppression of the lobster, *Nephrops norvegicus*. *Aquatic Toxicology* 70:223-231
- Holloway G, Sibly R, Povey S (1990) Evolution in toxin-stressed environments. *Functional Ecology* 4:289-294
- Hultmark D (2003) *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Current Opinion in Immunology* 15:12-19
- Huvet A, Herpin A, Dégremont L, Labreuche Y, Samain J, Cunningham C (2004) The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* 343:211-220
- Hyne R, Aistrope M (2008) Calibration and field application of a solvent-based cellulose membrane passive sampling device for the monitoring of polar herbicides. *Chemosphere* 71:611-620
- Ifremer (2009) Mortalités anormales d'huîtres creuses en 2009. http://www.ifremer.fr/institut/institut/actualites/mortalites_d_huitres_creuses.
- Imai T, Numachi K, Oizumi J, Sato S (1965) Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima bay II. Search for the cause of mass mortality and the possibility to prevent it by transplantation experiment. *Bulletin of the Tohoku National Fisheries Research Institute* 25:27-38
- Ingebrigtsen J, Flurkey W (1988) Affinity and hydrophobic chromatography of mushroom tyrosinase. *Phytochemistry* 27:1593-1599
- Jaenicke E, Decker H (2003) Tyrosinases from crustaceans form hexamers. *Biochemistry Journal* 371:515-523
- Jeong W-G, Cho S-M (2005) The effects of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure on the fertilization and larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* 24:209-213
- Jiménez M, Chazarra S, Escribano J, Cabanes J, García-Carmona F (2001) Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 49:4060-4063
- Jing G, Li Y, Xie L, Zhang R (2006) Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 144:184-190
- Jing G, Li Y, Xie L, Zhang R (2007) Different effects of Pb²⁺ and Cu²⁺ on immune and antioxidant enzyme activities in the mantle of *Pinctada fucata*. *Environmental Toxicology & Pharmacology* 24:122-128
- Johannes C, Majcherczyk A (2000) Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* 78:193-199
- Johansson M, Söderhäll K (1989) Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today* 5:171-176
- Johansson M (1999) Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. *Developmental & Comparative Immunology* 23:303-315
- Johnston S (1981) Estuarine dredge and fill activities: A review of impacts. *Environmental Management* 5:427-440

- Jones G, Saleuddin A (1978) Cellular mechanisms of periostracum formation in *Physa* spp. (*Mollusca: Pulmonata*). *Canadian Journal of Zoology* 56:2299-2311
- Jordan P, Deaton L (2005) Characterization of phenoloxidase from *Crassostrea virginica* hemocytes and the effect of *Perkinsus marinus* on phenoloxidase activity in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Geukensia demissa*. *Journal of Shellfish Research* 24:477-482
- Kawai K (1959) The cytochrome system in marine lamellibranch tissues. *Biological Bulletin* 117:125-132
- Kazimirova M, Slovak M (1996) Effects of heavy metals and fluorine on phagocytosis and phenoloxidase activity in *Mamestra brassicae* (*Lepidoptera: Noctuidae*). *European Journal of Entomology* 93:467-473
- Keilin D, Mann T (1938) Polyphenol oxidase. Purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society of London B* 125:187-204
- Kermasha S, Goetghebeur M, Monfette A, Metche M, Rovel B (1993) Studies on inhibition of mushroom polyphenol oxidase using chlorogenic acid as substrate. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 41:526-531
- Kim Y, Uyama H (2005) Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:1707-1723
- Kubowitz F (1938) Cleavage and resynthesis of polyphenoloxidase and hemocyanin. *Biochemistry* 299:32-57
- Labreuche Y, Soudant P, Gonçalves M, Lambert C, Nicolas J-L (2006) Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology* 30:367-379
- Lacoste A, Jalabert F, Malham S, Cueff A, Poulet S (2001a) Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *General & Comparative Endocrinology* 67:2304-2309
- Lacoste A, Malham S, Cueff A, Poulet S (2001b) Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas*. *General & Comparative Endocrinology* 122:181-188
- Lacoue-Labarthe T, Bustamante P, Hörlin E, Luna-Acosta A, Bado-Nilles A, Thomas-Guyon H (2009) Phenoloxidase activation in the embryo of the common cuttlefish *Sepia officinalis* and responses to Ag and Cu exposure. *Fish & Shellfish Immunology* 27:516-521
- Lagadic L, Caquet T, Ramade F (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* 3:193-208
- Lagadic L, Caquet T, Amiard J, Ramade F (1997) Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux. Masson, Paris, p 418
- Lee J, Kong K, Cho S (1997) Purification and characterization of tyrosinase from *Solanum melongena*. *Journal of Biochemistry & Molecular Biology* 30:150-156
- Li M, Garrett C (1998) The relationship between oil droplet size and upper ocean turbulence. *Marine Pollution Bulletin* 36:961-970

- Liang J, Wang Y, Sun H (2007) The electron microscopic cytochemistry study of peroxidase and phenoloxidase in the mantle of *Chlamys farreri*. *Ludong University Journal (Natural Science Edition)* 1:22-30
- Liang Z, Söderhäll K (1995) Isolation of cDNA encoding a novel serpin of crayfish hemocytes. *Comparative Biochemistry & Physiology B* 112:385-391
- Liu G, Yang L, Fan T, Cong R, Tang Z, Sun W, Meng X, Zhu L (2006) Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica*. *Fish Shell Immunol* 20:47-57
- Livingstone D, Kirchin M, Wiseman A (1989) Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. *Xenobiotica* 19:1041-1062
- Lowe D, Fossato V (2000) The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon. *Aquatic Toxicology* 48:75-85
- Lugasi A (1997) Natural antioxidants: Chemistry, health effects and application. AOCS Press, Champaign, Illinois p 414
- Luna-Acosta A, Rosenfeld E, Amari M, Fruitier-Arnaudin I, Bustamante P, Thomas-Guyon H (2010a) First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology* 28:719-726
- Luna-Acosta A, Bustamante P, Godefroy J, Fruitier-Arnaudin I, Thomas-Guyon H (2010b) Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on the health status of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* *Environmental Science and Pollution Research* 17:999-1008
- Luna-González A, Maeda-Martínez A, Vargas-Albores F, Ascencio-Valle F, Robles-Mungaray M (2003) Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology* 15:275-282
- Malanga C, Young S-I (1978) The metabolic fate of dopamine in the ciliated gill epithelium of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 60:129-136
- Manahan S (2003) Toxicological chemistry and biochemistry. Lewis publishers, Boca Raton p 425
- Manduzio H, Monsinjon T, Galap C, Leboulenger F, Rocher B (2004) Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquatic Toxicology* 70:83-93
- Marques L, Fleuret A, Macheix J (1995) Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiology and Biochemistry* 33:193-200
- Martinez-Alvarez O, Montero P, Gomez-Guillen C (2008) Evidence of an active laccase-like enzyme in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Food Chemistry* 108:624-632
- Maruyama N, Etoh H, Sakata K, Ina K (1991) Studies on phenoloxidase from *Mytilus edulis* associated with adhesion. *Agricultural and Biological Chemistry* 55:2887-2889

- Matoba Y, Kumagai T, Yamamoto A, Yoshitsu H, Sugiyama M (2006) Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* 281:8981-8990
- Mazzafera P, Robinson S (2000) Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry* 55:285-296
- Minier C, Lelong C, Djemel N, Rodet F, Tutundjian R, Favrel P, Mathieu M, Leboulenger F (2002) Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research* 54:455-459
- Miossec L, Allain G, Arzul I, Francois C, Garcia C, Cameron A (2009) First results of an epidemiological study on oyster (*Crassostrea gigas*) mortality events in France during summer 2008. *International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*, Durban
- Montagnani C, Avarre J, de Lorgeril J, Quiquand M, Boulo Z, Escoubas J (2007) First evidence of the activation of Cg-TIMP, an immune response component of Pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Developmental & Comparative Immunology* 31:1-11
- Montagnani C, Le Roux F, Berthe F, Escoubas J-M (2001) Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *FEBS Letters* 500:64-70
- Montero P, Ávalos A, Pérez-Mateos M (2001a) Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: Additives and high-pressure treatment. *Food Chemistry* 75:317-324
- Montero P, Lopez-Caballero M, Perez-Mateos M (2001b) The effect of inhibitors and high pressure treatment to prevent melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*). *Journal of Food Science* 66:1201-1206
- Montes J, Durfort M, García-Valero J (1995) Cellular defence mechanism of the clam, *Tapes semidecussatus*, against infection by the protozoan *Perkinsus sp.* *Cell and Tissue Research* 279:529-538
- Moore M, Depledge M, Readman J, Paul Leonard D (2004a) An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552:247-268
- Moore M, Lowe D, Kohler A (2004b) Biological effects of contaminants: Measurements of lysosomal membrane stability ICES Techniques in Marine Environmental Sciences (TIMES). ICES, Copenhagen
- Munaron D (2004) Study of herbicides and nutrients inputs by the Charente river to the coast and modelling of the dispersion of atrazine in the Marennes-Oléron bay. *Université Pierre et Marie Curie Paris V*, p 341
- Muñoz I, López-Doval J, Ricart M, Villagrasa M, Brix R, Geiszinger A, Ginebreda A, Guasch H, López de Alda M, Romani A, Sabater S, Barceló D (2009) Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat river basin (Northeast Spain). *Environmental Toxicology & Chemistry* 28:2706-2714

- Muñoz P, Meseguer J, Esteban M (2006) Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 20:12-19
- Murata M, Tsurutani M, Hagiwara S, Homma S (1997) Subcellular location of polyphenol oxidase in apples. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 61:1495-1499
- Nagai K, Yano M, Morimoto K, Miyamoto H (2007) Tyrosinase localization in mollusc shells. *Comparative Biochemistry & Physiology B* 146:207-214
- Nappi A, Vass E (2001) Cytotoxic reactions associated with insect immunity. In: Beck G (ed) *Phylogenetic perspectives on the vertebrate immune system*. Springer, p 329-342
- Naraoka T, Uchisawa H, Mori H, Matsue H, Chiba S, Kimura A (2003) Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mollusk, *Illex argentinus*. *European Journal of Biochemistry* 270:4026-4038
- Neumann N, Stafford J, Barreda D, Ainsworth A, Belosevic M (2001) Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental & Comparative Immunology* 25:807-825
- Newton K, Peters R, Raftos D (2004) Phenoloxidase and QX disease in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Developmental & Comparative Immunology* 28:565-569
- NIMPIS (2009) National Introduced Marine Pest Information System. *Crassostrea gigas* general information. <http://www.marinepests.gov.au/nimpis> (accessed 24 August 2009).
- Olafsen J, Fletcher T, Grant P (1992) Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following *in vivo* *Vibrio anguillarum* challenge. *Developmental & Comparative Immunology* 16:123-138
- Olicard C, Renault T, Torhy C, Benmansour A, Bourgougnon N (2005) Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Research* 66:147-152
- Oliver L, Fisher W (1995) Comparative form and function of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes from Chesapeake Bay (Virginia) and Apalachicola Bay (Florida). *Diseases of Aquatic Organisms* 22:217-225
- Oliver L, Fisher W, Winstead J, Hemmer B, Long E (2001) Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquatic Toxicology* 55:203-222
- Oliver L, Fisher W, Volety A, Malaeb Z (2003) Greater hemocyte bactericidal activity in oysters (*Crassostrea virginica*) from a relatively contaminated site in Pensacola Bay, Florida. *Aquatic Toxicology* 64:363-373
- Orbea A, Ortiz-Zarragoitia M, Sole M, Porte C, Cajaraville MP (2002) Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology* 58:75-98
- 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

- Pang Q, Zhang S, Shi X, Su F, Wu D (2005) Purification and characterisation of phenoloxidase from *amphioxus Branchiostoma belcheri tsingtauense*. *Fish & Shellfish Immunology* 19:139-148
- Paparo A, Aiello E (1970) Cilio-inhibitory effects of branchial nerve stimulation in the mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative and General Pharmacology* 1:241-250
- Parant M (1998) Xenobiotic metabolism in bivalves. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 321:485-494
- Pelmont J (1995) *Enzymes - Catalyseurs du monde vivant*. Grenoble Sciences, Grenoble p 1039
- Perdomo-Morales R, Montero-Alejo V, Perera E, Pardo-Ruiz Z, Alonso-Jimenez E (2007) Phenoloxidase activity in the hemolymph of the spiny lobster *Panulirus argus*. *Fish & Shellfish Immunology* 23:1187-1195
- Perdue J, Beattie J, Chew K (1981) Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *Journal of Shellfish Research* 1:9-16
- Pérez-Gilabert M, García Carmona F (2000) Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *Journal of Agriculture & Food Chemistry* 48:695-700
- Perry C, Matcham S, Wood D, Thurston C (1993) The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology* 139:171-178
- Peters R, Raftos D (2003) The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture* 223:29-39
- Phillips D (1980) Quantitative aquatic biological indicators: their use to monitor trace metals and organochlorine pollution. *Pollution Monitoring Series*, London, p 488
- Piferrer F, Beaumont A, Falguiere J-C, Flajshans M, Haffray P, Colombo L (2009) Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293:125-156
- Pipe R, Coles J, Carissan F, Ramanathan K (1999) Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 46:43-54
- Polacheck I, Hearing V, Kwon-Chung K (1982) Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology* 150:1212-1220
- Pomati F, Netting A, Calamari D, Neilan BA (2004) Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis sp.* and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology* 67:387-396
- Pomerantz S (1963) Separation, purification, and properties of two tyrosinases from hamster melanoma. *The Journal of Biological Chemistry* 238:2351-2357
- Porte C, Janer G, Lorusso L, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville M, Fossi M, Canesi L (2006) Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 143:303-315
- Porte C, Sole M, Albaigés J, Livingstone DR (1991) Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus sp.* to organic pollution. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 100:183-186

- Prado-Alvarez M, Rotllant J, Gestal C, Novoa B, Figueras A (2009) Characterization of a C3 and a factor B-like in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus*. *Fish & Shellfish Immunology* 26:305-315
- Prota G, Ortonne J, Voulot C, Khatchadourian C, Nardi G, Palumbo A (1981) Occurrence and properties of tyrosinase in ejected ink of cephalopods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 118:463-469
- Renault T, Le Deuff R, Chollet B, Cochenne N, Gerard A (2000) Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 3:173-183
- Renwantz L, Schmalmack W, Redel R, Friebel B, Schneeweib H (1996) Conversion of phenoloxidase and peroxidase indicators in individual haemocytes of *Mytilus edulis* specimens and isolation of phenoloxidase from haemocyte extract. *Journal of Comparative Physiology B* 165:647-658
- Richard-Forget F, Goupy P, Nicolas J (1994) New approaches for separating and purifying apple polyphenol oxidase isoenzymes: Hydrophobic, metal chelate and affinity chromatography. *Journal of Chromatography A* 667:141-153
- Riley P (1997) Melanin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29:1235-1239
- Robbens J, van der Ven K, Maras M, Blust R, De Coen W (2007) Ecotoxicological risk assessment using DNA chips and cellular reporters. *Trends in Biotechnology* 25:460-466
- Ross K, Cooper N, Bidwell J, Elder J (2002) Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: A comparison between populations from contaminated and reference sites. *Marine Pollution Bulletin* 44:671-679
- Rowley A, Powell A (2007) Invertebrate immune systems—specific, quasi-specific, or nonspecific? *The Journal of Immunology* 179:7209 -7214
- Samain J, McCombie H (2008) Summer mortality Pacific oyster *Crassostrea gigas*: The Morest Project. *Éditions Quae, Versailles*, p 379
- Scotti P, Dearing S, Greenwood D, Newcomb R (2001) Pernin: a novel self-aggregating haemolymph protein from the New Zealand greenlipped mussel, *Perna canaliculus* *Comparative Biochemistry & Physiology B* 128:767-779
- Scotti P, Dearing S, Greenwood D (2007) Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 41:91-101
- Schlenk D, Buhler D (1989) Xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Comparative Biochemistry & Physiology C* 94:469-475
- Schosinsky K, Lehmann H, Beeler M (1974) Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. *Clinical Chemistry* 20:1556-1563
- Shankar M, Nélieu S, Kerhoas L, Einhorn J (2008) Natural sunlight -induced photo-degradation of phenylurea herbicides in water. *Chemosphere* 71:1461-1468
- Shatta A, El-Shamei Z (1999) Differentiation of eggplant (*Solanum melongena*) polyphenoloxidase, laccase and peroxidase using selective substrates and inhibitors. *Advances in Food Sciences* 21:79-83

- Simkiss K, Taylor M, Mason A (1982) Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. *Marine Biology Letters* 3:187-201.
- Simonian M, Nair S, Nell J, Raftos D (2009) Proteomic clues to the identification of QX disease-resistance biomarkers in selectively bred Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. *Journal of Proteomics* 73:209-217
- Simpson B, Gagne N, Ashie I, Noroozi E (1997) Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp (*Pandalus borealis*). *Food Biotechnology* 11:25-44
- Smith L, Stotz E (1954) Purification of cytochrome c oxydase *The Journal of Biological Chemistry* 209:819-828
- Smith V, Johnston P (1992) Differential haemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp, *Crangon crangon*. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 101:641-649
- Smith V, Swindlehurst R, Johnston P, Vethaak A (1995) Disturbance of host defence capability in the common shrimp, *Crangon crangon*, by exposure to harbour dredge spoils. *Aquatic Toxicology* 32:43-58
- Smolowitz R, Leavitt D, Perkins F (1998) Observations of a protistan disease similar to QPX in *Mercenaria mercenaria* (hard clams) from the coast of Massachusetts. *Journal of Invertebrate Pathology* 71:9-25
- Snieszko S (1974) The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology* 6:197-208
- Söderhäll K, Cerenius L (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10:23-28
- Sole M, Porte C, Albaiges J (1994) Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: its relation with contaminant burdens. *Aquatic Toxicology* 30:271-283
- Soletchnik P, Le Moine O, Faury N, Razet D, Geairon P, Gouletquer P (1999) Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron: étude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d'informations géographiques (SIG). *Aquatic Living Resources* 12:131-143
- Soletchnik P, Faury N, Gouletquer P (2006) Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron bay (France). *Aquaculture* 252:328-338
- Solomon E, Sunduran U, Machonkin T (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* 96:2563-2606
- Sugumar G, Nakai T, Hirata Y, Matsubara D, Muroga K (1998) *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 33:111-118
- Tanguy A, Mura C, Moraga D (2001) Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). *Aquatic Toxicology* 55:35-47
- Tanguy A, Boutet I, Bonhomme F, Boudry P, Moraga D (2002) Polymorphism of metallothionein genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* as a biomarker of response to metal exposure. *Biomarkers* 7:439-450

- Tanguy A, Guo X, Ford S (2004) Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern *Crassostrea virginica* and Pacific *C. gigas* oysters. *Gene* 338:121-131
- Tanguy A, Boutet I, Laroche J, Moraga D (2005) Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS Journal* 272:390-403
- Thiagarajan R, Gopalakrishnan S, Thilagam H (2006) Immunomodulation the marine green mussel *Perna viridis* exposed to sub-lethal concentrations of Cu and Hg. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51:392-399
- Thomas-Guyon H, Gagnaire B, Bado-Nilles A, Bouilly K, Lapegue S, Renault T (2009) Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Developmental & Comparative Immunology* 33:653-659
- Tixier C, Singer H, Oellers S, Müller S (2003) Occurrence and fate of carbamazepine, clofibrac acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science and Technology* 37:1061-1068
- Travers M-A, Le Goïc N, Huchette S, Koken M, Paillard C (2008) Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 25:800-808
- Tujula N, Radford J, Nair S, Raftos D (2001) Effects of tributyltin and other metals on the phenoloxidase activating system of the tunicate, *Styela plicata*. *Aquatic Toxicology* 55:191-201
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology & Pharmacology* 13:57-149
- Van Gelder C, Flurkey W, Wichers H (1997) Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45:1309-1323
- Van Ooik T, Rantala M, Saloniemi I (2007) Diet-mediated effects of heavy metal pollution on growth and immune response in the geometrid moth *Epirrita autumnata*. *Environmental Pollution* 145:348-354
- Waechter M, Le Roux F, Nicolas J, Marissal E, Berthe F (2002) Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. *Comptes Rendus Biologies* 325:231-238
- Waite J, Wilbur K (1976) Phenoloxidase in the periostracum of the marine bivalve *Modiolus demissus* Dillwyn. *Journal of Experimental Zoology* 195:359-367
- Walker J, McCallion R (1980) The selective inhibition of *ortho*- and *para*-diphenol oxidases. *Phytochemistry* 19:373-377
- Walker J, Ferrar P (1998) Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 15:457-498
- Wendelaar-Bonga S (1997) The stress response in fish. *Physiological Review* 77:591-625
- Winston G (1991) Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 100:173-176

- Xue Q, Renault T (2000) Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology* 76:155-163
- Yatsu J, Asano T (2009) Cuticle laccase of the silkworm, *Bombyx mori*: Purification, gene identification and presence of its inactive precursor in the cuticle. *Insect Biochemistry & Molecular Biology* 39:254-262
- Yeh S-P, Sung T-G, Chang C-C, Cheng W, Kuo C-M (2005) Effects of an organophosphorus insecticide, trichlorfon, on hematological parameters of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture* 243:383-392
- Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M (1996) Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Biological Chemistry* 271:13854-13860
- Yu J, Choi M, Park K, Park S (2010) Effects of anoxia on immune functions in the surf clam *Macraa veneriformis*. *Zoological Studies* 49:94-101
- Zavarzina A, Zavarzin A (2006) Laccase and tyrosinase activities in lichens. *Microbiology* 75:546-556
- Zhang C, Xie L, Huang J, Chen K, Zhang R (2006) A novel putative tyrosinase involved in periostracum formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342:632-639
- Zhang X, Flurkey W (1997) Phenoloxidases in *Portabella* mushrooms. *Journal of Food Science* 62:97-100
- Zhao M, Söderhäll I, Won Park J, Ma Y, Osaki T, Ha N, Wu C, Söderhäll K, Lee B (2005) A novel 43-kDa protein as a negative regulatory component of phenoloxidase-induced melanin synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 280:24744-24751
- Zufelato M, Lourenço A, Simoes L, Jorge J, Bitondi M (2004) Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochemistry & Molecular Biology* 34:1257-1268

Annexes



Source : <http://conchyliculture.free.fr/>

Annexe 1 : Matériels et méthodes relatifs au protocole optimisé du dosage des phénoloxydases chez *Crassostrea gigas*

Protocole optimisé du dosage des phénoloxydases chez *C. gigas*

1. But de la manipulation :

Le but de ce protocole est de permettre la mesure de l'activité enzymatique de type phénoloxydase dans des échantillons variés, préparés à partir de tissus de *Crassostrea gigas*.

2. Principe de la mesure :

L'échantillon contenant la phénoloxydase est mis en présence d'un substrat des PO (L-DOPA ou dopamine pour doser l'activité catécholase, PPD pour doser l'activité laccase), aboutissant à la formation d'une quinone qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 490 nm (pour la L-DOPA et la dopamine) ou de 420 nm (pour la PPD). Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance à la longueur d'onde choisie est proportionnelle à la concentration du produit de la réaction. Lorsque l'on se situe en vitesse initiale la concentration du produit, et par conséquent son absorbance à une longueur d'onde donnée, augmente de façon linéaire en fonction du temps. Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme responsable de l'apparition d'une μ mole de produit par minute (Pomerantz, 1963).

3. Produits chimiques :

Nom	Formule	MM (g.mol ⁻¹)	Description
Trizma hydroxychloride	Tris HCl	157,60	Dans la composition du tampon
Chlorure de sodium	NaCl	58,44	Dans la composition du tampon
Dichlorure de calcium	CaCl ₂	147,02	Dans la composition du tampon
Dichlorure de magnésium	MgCl ₂	203,31	Dans la composition du tampon
L-DOPA	3,4-Dihydroxy-L-phénylalanine, (HO) ₂ C ₆ H ₃ CH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	197,19	Substrat des catécholases
Dopamine	3,4-Dihydroxyphénéthylamine, (HO) ₂ C ₆ H ₃ CH ₂ CH ₂ NH ₂ .HCl	189,64	Substrat des catécholases
PPD	p-Phénylènediamine, C ₆ H ₄ (NH ₂) ₂	108,14	Substrat des laccases
Méthanol	CH ₃ OH		Pour solubiliser la PPD
PTU	1-Phényl-2-thiourée, C ₆ H ₅ NHCSNH ₂	152,22	Inhibiteur de toutes les PO
CTAB	Bromure de céthyl triméthyl ammonium CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(Br)(CH ₃) ₃	364,45	Inhibiteur des laccases
4-HR	4-hexylrésorcinol	194,13	Inhibiteur des catécholases

4. Préparation des solutions de travail :

Tampon TrisHCl 0,1 M pH 7,0, Vf = 1 L:

15,760 g de Tris HCl (0,1 M)
26,298 g de sel NaCl (0,45 M ou 450 mM)
1,470 g de CaCl₂ (10 mM)
5,286 g de MgCl₂ (26 mM)

Ajuster le pH à 7,0 à l'aide de l'addition de NaOH 0,1 M.

Solution mère de L-DOPA pour une concentration finale de 10 mM :

27,6 mg de L-DOPA
8 ml de tampon Tris HCl 0,1 M pH 7,0

Solution mère de Dopamine pour une concentration finale de 100 mM :

265,5 mg de Dopamine
8 ml de tampon Tris HCl 0,1 M pH 7,0

Solution mère de p-phénylènediamine (PPD) pour une concentration finale de 50 mM :

432,6 mg de PPD
4 ml de Méthanol

NB : nous avons testé au préalable l'effet du méthanol sur l'activité de type PO. Aucun effet, pour les quantités qu'on utilise (i.e. 7 µl de PPD dilué dans du méthanol dans 140 µl de volume final de milieu réactionnel), n'a été observé.

PTU pour une concentration finale de 5 mM :

15,2 mg de PTU
10 ml de Tris HCl 0,1M pH 7,0

CTAB pour une concentration finale de 1 mM :

7,3 mg de CTAB
10 ml de Tris HCl 0,1M pH 7,0

4-HR pour une concentration finale de 1 mM :

3,9 mg de 4-HR
10 ml de Tris HCl 0,1M pH 7,0

5. Tests d'activité enzymatique:

Les mesures sont faites à une température ambiante de 25°C dans une microplaque 96 puits à fond plat, de marque NUNC (France).

Les substrats L-DOPA, dopamine et PPD sont susceptibles de s'oxyder en absence de l'enzyme (phénomène d'autooxydation). De ce fait le témoin 3 est réalisé (tableau ci-

dessous). Ainsi les valeurs d'absorbance obtenues dans le témoin 3 seront retranchées des valeurs obtenues dans l'essai, permettant le calcul de l'activité enzymatique. Les témoins 1 et 2 sont des contrôles qui permettent juste de vérifier que l'activité mesurée est bien due à la présence d'une phénoloxydase.

En présence d'inhibiteur un témoin supplémentaire est réalisé par inhibiteur (Témoins 4, 5 et 6). Une incubation préalable de l'échantillon avec l'inhibiteur pendant 20 min. est réalisée avant d'initier la réaction par l'addition du substrat. La valeur d'absorbance obtenue pour le témoin 4 sera retranchée de la valeur de l'Essai Inh1, celle obtenue pour le témoin 5 sera retranchée de la valeur de l'Essai Inh2, celle obtenue pour le témoin 6 sera retranchée de la valeur de l'Essai Inh3.

De la même façon, des tests avec des molécules décrites dans la littérature comme étant des activateurs des formes proPO (trypsine-TPCK, sodium dodécyl sulfate (SDS), lipopolysaccharides (LPS)) peuvent être réalisés sur le même principe que celui utilisé avec les inhibiteurs.

Dans une microplaque 96 puits à fond plat, le substrat sera rajouté en dernier pour initier la réaction et donc la cinétique (respecter l'ordre évoqué ci-dessous) :

5.1. Schéma expérimental utilisant le substrat L-DOPA (10 mM) ou Dopamine (100 mM) (lectures réalisées à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque SpectraMax, Molecular Devices ou SAFAS Xenius XM):

	Témoin 1	Témoin 2	Témoin 3	Témoin 4	Témoin 5	Témoin 6	Essai	Essai Inh 1	Essai Inh 2
Echantillon		10 µl					10 µl	10 µl	10 µl
Inhibiteur				10 µl Inh 1	10 µl Inh 2	10 µl Inh 3		10 µl	10 µl
Tampon Tris	140 µl	130 µl	60 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	40 µl	40 µl
Substrat			80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl

5.2. Schéma expérimental utilisant le substrat PPD (50 mM) (lectures réalisées à 420 nm à l'aide d'un lecteur microplaque SpectraMax, Molecular Devices ou SAFAS Xenius XM) :

	Témoin 1	Témoin 2	Témoin 3	Témoin 4	Témoin 5	Témoin n 6	Essai	Essai Inh 1	Essai Inh 2
Echantillon		10 µl					10 µl	10 µl	10 µl
Inhibiteur				10 µl Inh 1	10 µl Inh 2	10 µl Inh 3		10 µl	10 µl
Tampon Tris	140 µl	130 µl	133 µl	123 µl	123 µl	123 µl	123 µl	113 µl	113 µl
Substrat			7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl

■ Préincubation de 20 min. de l'inhibiteur (ou activateur) avec l'échantillon avant dosage de l'activité PO.

6. Cinétique :

Mesure toutes les minutes pendant :

5h en présence de L-DOPA

4h en présence de Dopamine

2h en présence de PPD

En mélangeant pendant 10 secondes avant chaque mesure.

7. Calculs :

A chaque réaction, une phase de latence est observée. La vitesse initiale (v_i) doit être calculée dans la partie linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du temps. Elle est calculée entre 3h et 5h avec le substrat L-DOPA, entre 2h et 4h avec dopamine et entre 1h et 2h avec PPD. L'absorbance en fonction du temps est enregistrée pour :

Le témoin 2

L'essai

Et la valeur des pentes est directement obtenue à l'issue de chaque cinétique.

Retrancher ensuite la valeur de pente du témoin 2 à celle de l'essai. Cette nouvelle valeur correspond alors à la vitesse initiale de l'activité enzymatique phénoloxydase (corrigée pour l'autooxydation du substrat). Elle s'exprime en $\bullet \text{ A.min}^{-1} \cdot 10^{-3}$.

En biochimie, on exprime en général l'activité enzymatique en unité d'activité.ml⁻¹. Dans le cas des phénoloxydases, une unité d'activité enzymatique peut être définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la production d'une μmole de produit par minute (Pomerantz, 1963). Le volume de l'échantillon utilisé dans la microplaque a été de 10 μl . Ainsi, si on applique la loi de Beer-Lambert et sachant que le trajet optique pour 140 μl de volume final en microplaque est de 0,46 cm puis que $\bullet = 3\ 600, 3\ 300$ et $43\ 160 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour les produits issus de l'oxydation de L-DOPA, dopamine et PPD, respectivement (Pomerantz, 1963; Eggert et al., 1996), l'équation utilisée sera :

$$\text{AE (U.ml}^{-1}\text{)} = 10^6 * \bullet \text{ A.min}^{-1} \cdot 10^{-3} / (0,01 * 0,46 * \bullet)$$

Le facteur 10^6 utilisé dans l'équation permet tout simplement d'exprimer le résultat en $\mu\text{moles.min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$.

L'étape finale des calculs consiste à exprimer l'activité phénoloxydase en activité spécifique (AS). Pour ceci on tient compte de la concentration protéique de l'échantillon (en mg.ml^{-1}). Ainsi,

$$\text{AS (U.mg prot}^{-1}\text{ ou } \mu\text{mol.min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}\text{)} = \text{AE} / \text{concentration protéique}$$

8. Analyses statistiques :

Pour chaque condition, les analyses en microplaque sont réalisées en triplicatas. On travaille sur trois pools de tissus ou de compartiment hémolymphatique diifférent, pour chaque condition. Chaque pool est fait à partir de 10 huîtres. On obtient ainsi 9 valeurs par condition, i.e. 3 réplicas de mesure sur 3 pools différents. Les valeurs sont testées pour la normalité (test de Shapiro) et l'homogénéité des variances (test de Bartlett). Dans certains cas, des transformations de données (e.g., les transformations logarithmiques (Log_{10})) pourront être réalisées pour respecter ces deux critères. Des ANOVA hiérarchisées sont utilisées pour analyser les résultats, avec les conditions comme facteurs fixés, et le pool comme un facteur aléatoire (Zar 1984). Quand l'hypothèse nulle (H_0 : pas de différence entre conditions) est rejetée, les différences significatives sont testées en utilisant un test de Tukey HSD. Pour des valeurs ne respectant pas les critères de normalité et/ou d'homogénéité des variances, des tests de Kruskal-Wallis, suivis de tests de comparaison multiple de Dunn, peuvent être réalisés.

9. Références :

- Pomerantz, S., 1963. Separation, purification, and properties of two tyrosinases from hamster melanoma. *The Journal of Biological Chemistry* 238, 2351-2357.
- C. Eggert, U. Temp, K. Eriksson, The lignolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase, *Applied & Environmental Microbiology* 62 (1996) 1151-1158.
- Zar, J., 1984. *Biostatistical analysis*, Prentice-Hall, New Jersey, p 718.

Annexe 2 : First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Fish & Shellfish Immunology 28 (2010) 719–726



Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

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



First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Andrea Luna-Acosta*, Eric Rosenfeld, Myriam Amari, Ingrid Fruitier-Arnaudin,
Paco Bustamante, Hélène Thomas-Guyon*

Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

* Corresponding authors: H. Thomas-Guyon and A. Luna-Acosta
Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs),
UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle,
2 rue Olympe de Gouges
F-17042 La Rochelle Cedex 01, France
Email : hthomas@univ-lr.fr / aluna1508@yahoo.com
Tel : +33 (0)5 46 50 76 23
Fax : +33 (0)5 46 50 76 63

Abstract

Phenoloxidases (POs) are a family of enzymes including tyrosinases, catecholases and laccases, which play an important role in immune defence mechanisms in various invertebrates. The aim of this study was to thoroughly identify the PO-like activity present in the hemolymph of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, by using different substrates (i.e. dopamine and *p*-phenylenediamine, PPD) and different PO inhibitors. In order to go deeper in this analysis, we considered separately plasma and hemocyte lysate supernatant (HLS). In crude plasma, oxygraphic assays confirmed the presence of true oxidase activities. Moreover, the involvement of peroxidase(s) was excluded. In contrast to other molluscs, no tyrosinase-like activity was detected. With dopamine as substrate, PO-like activity was inhibited by the PO inhibitors tropolone, phenylthiourea (PTU), salicylhydroxamic acid and diethyldithio-carbamic acid, by a specific inhibitor of tyrosinases and catecholases, i.e. 4-hexylresorcinol (4-HR), and by a specific inhibitor of laccases, i.e. cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). With PPD as substrate, PO-like activity was inhibited by PTU and CTAB. In precipitated protein fractions from plasma, and with dopamine and PPD as substrates, PTU and 4-HR, and PTU and CTAB inhibited PO-like activity, respectively. In precipitated protein fractions from hemocyte lysate supernatant, PTU and CTAB inhibited PO-like activity, independently of the substrate. Taken together, these results suggest the presence of both catecholase- and laccase-like activities in plasma, and the presence of a laccase-like activity in HLS. To the best of our knowledge, this is the first time that a laccase-like activity is identified in a mollusc by using specific substrates and inhibitors for laccase, opening new perspectives for studying the implication of this enzyme in immune defence mechanisms of molluscs of high economic value such as *C. gigas*.

Key Words: phenoloxidase; catecholase; melanin; mollusc;bivalve;hemolymph; hemocyte; plasma

1. Introduction

Phenoloxidases are a family of copper proteins, widely distributed in microorganisms, plants and animals [1, 2]. They are the rate limiting enzymes in enzymatic browning in fruits and vegetables, and in melanization in animals. Melanin production starts with the oxidation of phenols and the concomitant reduction of O₂ to water. This reaction is catalysed by POs and yields to corresponding quinones, which are then polymerized by non-enzymatic reactions toward the formation of melanin [3]. Melanin and intermediates are toxic substances with fungistatic, bacteriostatic and antiviral properties [4]. In invertebrates, PO enzymes are also involved in many cellular defence responses, such as self/non-self recognition, phagocytosis and nodule and capsule formation [4, 5]. Interestingly, similarities of the PO system have been drawn with other cascades involved in defence such as the *Drosophila*-Toll cascade and the mammalian complement and blood clotting [6].

A major constraint when studying POs is the ambiguity of nomenclature existing in the literature. POs include tyrosinases (monophenol, *o*-diphenol: O₂ oxidoreductase, EC 1.14.18.1), catecholases (*o*-diphenol: O₂ oxidoreductase, EC 1.10.3.1), and laccases (*p*-diphenol: O₂ oxidoreductase, benzenediol: O₂ oxidoreductase, EC 1.10.3.2). However, tyrosinases and POs, and tyrosinases and catecholases have been used in the literature as synonyms [7, 8], and tyrosinases and POs are given the same EC number even if they are not obviously the same. POs are capable of *o*-diphenol oxidation. However, among these three enzymes, only tyrosinases can hydroxylize monophenols (e.g. L-tyrosine) and only laccases can oxidise *p*-diphenols and aromatic amines (e.g. *p*-phenylenediamine) [9, 10]. In addition to that, various compounds have been described as inhibitors of these three types of POs with their respective specificity (Table 1).

POs have been detected in different bivalve species, such as mussels (*Mytillus edulis*, *Mytillus galloprovincialis*, *Perna viridis*), clams (*Ruditapes decussatus*), scallops (*Nodipecten subnodosus*) and oysters (*Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*, *Saccostrea glomerata*) [11-17]. Among bivalves, the Pacific oyster *C. gigas* (Thunberg, 1753) is an ecologically and economically important species that dominates over all other molluscs with respect to global world distribution and aquaculture production [18]. However, massive summer mortalities in *C. gigas* have become a widespread concern in the world in recent decades [19]. Among the different factors suspected to be responsible of these mortalities, impairment of immune defence functions, elicited by environmental factors, is considered to be of major importance [20]. The increasing interest for PO comes from its apparent role in immune defence mechanisms in oysters, e.g. in the resistance of *S. glomerata* to *Marteilia sydneyi* [17]. Moreover, ecotoxicological studies have shown that PO in *C. gigas* may be modulated by the presence of heavy metals or polyaromatic hydrocarbons [21, 22]. To the best of our knowledge, studies on PO in *C. gigas* have been carried out by using the non specific *o*-diphenol substrate L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA).

In this general context, the purpose of our work was to thoroughly identify the PO-like activity that has been previously detected in *C. gigas*. We compared PO activity in plasma from *C. gigas* in the presence of several tyrosinase, catecholase and laccase substrates

and inhibitors. Furthermore, we measured oxygen uptakes during enzymatic and non-enzymatic oxidation reactions. Finally, partial purification of proteins from plasma and hemocyte lysate supernatant was used to identify PO-like activities in the hemolymph.

2. Materials and methods

2.1. Oysters

One hundred 3 years old *C. gigas* (mean \pm SD; weight: 75.5 ± 8.7 g; length: 9 ± 3 cm) were purchased during October-November 2008 from shellfish farms in Aytré Bay (Charente Maritime, France), on the French Atlantic coast, and were processed immediately after their arrival in the laboratory.

2.2. Collection of plasma

After opening the oyster shells by cutting off the adductor muscle, a quantity (0.5-1 ml) of hemolymph was withdrawn directly from the pericardial cavity with a 1-ml syringe equipped with a needle (0.9 x 25 mm), and the hemolymph from 10 oysters was pooled to reduce inter-individual variation [21]. Hemolymph samples were centrifuged (260 g, 10 min, 4°C) to separate the cellular fraction (i.e. hemocytes) from plasma [23]. Aliquots (100 μ l) were stored at -80°C. Each aliquot was used only once.

2.3. Hemocyte lysate supernatant

Hemocytes were homogenized at 4°C in Tris buffer (0.1 M Tris HCl, 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂ and 10 mM CaCl₂) adjusted to pH 7. They were lysed using an Ultra-Turrax (T25 basic, IKA-WERKE) at 19 000 rpm for 30 sec and a Thomas-Potter homogenizer (IKA-Labortechnik, clearance 0.13-0.18mm) at 200 rpm for 1 min, and centrifuged at 10 000 x g for 10 min at 4°C. The resulting hemocyte lysate supernatant (HLS) was collected for enzymatic studies. Aliquots (100 μ l) were stored at -80°C. Each aliquot was used only once.

2.4. Chemicals

L-tyrosine, *p*-hydroxyphenyl propionic acid (PHPPA), 4-hydroxyanisole (4-HA), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), 3,4-dihydroxyphenyl propionic acid (DHPPA), catechol, dopamine, *p*-phenylenediamine (PPD), 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde azine (syringaldazine), 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), tropolone, 4-hexylresorcinol (4-HR), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), salicylhydroxamic acid (SHAM), sodium azide (NaN₃), diethyldithiocarbamate (DETC), 1-phenyl-2-thiourea (PTU), trizma hydrochloride (Tris HCl), sodium chloride (NaCl), ammonium sulphate ((NH₄)₂SO₄) and catalase from bovine liver were obtained from Sigma-Aldrich (France). 2-mercaptoethanol (2-ME) was obtained from MERCK (France). Magnesium chloride (MgCl₂) and calcium chloride (CaCl₂) were obtained from Acros (France).

2.5. Phenoloxidase assays

Phenoloxidase-like (PO-like) activity has been reported to be higher in plasma than in HLS from *C. gigas* [23]. Therefore, constitutive PO-like activity was first analyzed in crude plasma. PO-like activity was measured spectrophotometrically by recording the formation of *o*-quinones. The method of Asokan et al. [5] was used with some modifications. Working solutions of substrates were prepared just before use in Tris buffer (0.1 M Tris HCl, 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂ and 10 mM CaCl₂) adjusted to pH 7, except for PPD which was prepared in methanol. The latter did not affect PO-like activities in the conditions tested (data not shown). Samples were distributed in 96-well microplates (Nunc, France). Ten microliters of sample were incubated with 80 μ l of substrate and 50 μ l of Tris buffer at 25°C. Several control wells were systematically used: 'buffer control' containing only buffer, 'sample control' containing only sample and buffer, and 'non-enzymatic control' containing only substrate and buffer. Immediately after substrate addition, PO-like activity was monitored during 4h by following the increase of absorbance at a specific wavelength (Table 2). Because of solubility constraints, in the case of PPD, the protocol was slightly modified: 10 μ l of sample were incubated with 7 μ l of PPD and 123 μ l of buffer and PO-like activity was monitored during 2h. For all conditions, experiments were performed with three oyster pools. Each pool was tested in triplicate wells and average rates were calculated. For non-enzymatic oxidation, results were expressed as the mean value of the increment of absorbance per minute ($\Delta A_{\text{min}}^{-1}$). For enzymatic oxidation, results were systematically corrected for non-enzymatic autoxidation of the substrate. Specific activities (SA) were expressed in international units (IU) per mg of total protein. One IU is defined as the amount of enzyme that catalyzes the appearance of 1 μ mole of product per min [24].

Apparent Michaelis-Menten constants ($K_{m_{\text{app}}}$) and maximum velocities ($V_{m_{\text{app}}}$) were estimated from double reciprocal plots (Lineweaver-Burk) of velocity vs substrate concentration.

2.6. Phenoloxidase inhibition assay

PO inhibition assay was performed by preincubating 10 μ l of PO inhibitor (prepared at various concentrations in Tris buffer, Fig. 3) with 10 μ l of sample for 20 min, at 25°C. Then, PO assay was carried out with dopamine or PPD, at final concentrations of 100 mM and 50 mM, respectively. Experiments were performed with three oyster pools. Each pool was tested in triplicate wells and average rates were calculated. Enzymatic oxidation (in the presence of PO inhibitor) was systematically corrected for non-enzymatic autoxidation of the substrate (in the presence of PO inhibitor).

2.7. Hydrogen peroxide scavenging by exogenous catalase

Plasma (10 μ l) was preincubated at 25°C for 30 minutes in the presence of 10 μ l of catalase from bovine liver at 1000 U/ml [25]. The total scavenging of H₂O₂ was verified using the Catalase kit CAT-100 (Sigma) and specifications included (data not shown). Then, PO assay was carried out with dopamine (100 mM) or PPD (50 mM). The effect of catalase on non-enzymatic autoxidation was also followed by incubating (25°C, 30 min) the substrates (dopamine or PPD at 100 mM or 50 mM, respectively) in the presence of 10

µl of catalase. Enzymatic oxidation (in the presence of catalase) was systematically corrected for autoxidation of the substrate (in the presence of catalase). All the experiments were performed with three oyster pools. Each pool was tested in triplicate wells and average rates were calculated.

2.8. Protein determination

Protein concentration was determined by the slightly modified Lowry method, as described previously [26]. Serum albumin (Sigma-Aldrich, France) was used as standard.

2.9. Measurements of oxygen uptake

Oxygen uptake was followed with a Clark-type oxygen electrode (Hansatech, DW1) in a 700-µl closed chamber thermostatted at 25°C with continuous stirring [27]. In a typical experiment, oxygen uptakes were recorded simultaneously using four separate electrode units. In the first unit ('buffer control'), a volume of 700 µl of buffer was distributed in the chamber. In the second unit ('sample control'), 250 µl of plasma and 450 µl of buffer were distributed. In the third unit ('non-enzymatic control'), 700 µl of substrate (L-DOPA 10 mM or dopamine 100 mM) were distributed. In the fourth unit, 250 µl of plasma and 450 µl of substrate were distributed. With PPD (50 mM) as substrate, the same protocol was adopted with slight modifications, i.e. 500 µl of the sample were incubated with 35 µl of PPD and 165 µl of buffer. All the experiments were carried out with three oyster pools.

2.10. Preparation of protein fractions from plasma and hemocyte lysate supernatant

Plasma and HLS were precipitated overnight with 60% saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution at 4°C. After centrifugation at 10 000 x g for 10 min at 4°C, the precipitate was dissolved in 1 ml and dialyzed against Tris buffer. Partially purified fractions from plasma and hemocyte lysate supernatant were filtered through a 0.22-µm sterile filter (Millipore membrane-Millipore Co., Bedford, MA, USA), in order to eliminate the natural bacterial flora of samples. In order to make certain the absence of bacteria after this treatment, the samples were incubated with 4.0 ml of Zobell medium (4 g peptone, 1 g yeast extract, 0.1 g ferric phosphate, 30 g sea salt per liter) and grown at 25°C with shaking to allow potential bacterial growth. Then, $A_{620\text{nm}}$ readings were carried out at 0, 5 and 6 h, which evidenced the absence of bacterial growth (data not shown). Aliquots (100 µl) of the dialyzates were stored at -80°C before being tested for PO-like activity.

2.11. Statistical analysis

All values are reported as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was carried out with SYSTAT 11.0. Values were tested for normality (Shapiro test) and homogeneity of variances (Bartlett test). For normal values, an ANOVA test was used to analyse the results, followed by a Dunnett post-hoc test. For non normal values, a Kruskal-Wallis test was used, followed by a Dunn's multiple comparisons test [28]. Statistical significance was designed as being at the level of $p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$.

3. Results

3.1. Substrate specificity of PO-like activity in plasma

Enzymatic oxidation results were systematically corrected for non-enzymatic autoxidation. Table 2 shows that no PO-like activity was detected in the presence of PHPPA, L-tyrosine, 4-HA, DHPPA, syringaldazine and ABTS. Conversely, PO-like activity was detected using L-DOPA, dopamine and PPD, with final concentrations of substrate saturation being equal to 10 mM, 100 mM and 50 mM, respectively. Km_{app} values for L-DOPA, dopamine and PPD were 7, 51, and 45 mM, respectively (Table 2). Km_{app} for L-DOPA was thus 6 to 7 times lower than Km_{app} for dopamine and PPD. Vm_{app} values for L-DOPA, dopamine and PPD were 0.45, 0.51 and 0.59 $\Delta A \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-3}$, respectively (Table 2). Thus, Vm_{app} value obtained with PPD was 1.15 to 1.31 times higher than values obtained with L-DOPA and dopamine.

3.2. O₂ requirements of PO-like activity

Using oxygraphy, we easily confirmed the non-enzymatic autoxidation of L-DOPA, dopamine, and to a lesser extent, of PPD (Fig. 1). Most importantly, we found that O₂ uptake was higher in the presence of plasma, independently of the substrate, confirming the presence of at least one PO-type oxidase in plasma.

3.3. Effect of catalase

Exogenous catalase was used to scavenge the H₂O₂ potentially involved in peroxidase-dependent oxidation reactions. Fig. 2a shows that catalase did not affect autoxidations of dopamine and PPD. Most importantly, catalase did not inhibit oxidations of both substrates in the presence of plasma (Fig. 2b). Fig. 2b also shows that catalase induced a two-fold increase of PO-like activity with dopamine as substrate.

3.4. Effect of various PO inhibitors

The next step in the identification of PO-like activity in plasma from *C. gigas* consisted on studying the effect of different PO inhibitors with dopamine and PPD as substrates. Results with dopamine are summarized in Fig. 3. Since many inhibitors are reducing agents, we systematically examined the effects of PO inhibitors on the non-enzymatic autoxidation. Autoxidation was reduced by using NaN₃ at 0.1 and 1 mM, and suppressed with 2-ME and DETC at 5 mM (Fig. 3a). These compounds were therefore not used at these concentrations for further studies. Moreover, enzymatic oxidation (in the presence of plasma and PO inhibitors) was systematically corrected for non-enzymatic autoxidation of the substrate (in the presence of PO inhibitors). Fig. 3b shows that enzymatic oxidation was strongly inhibited by 0.5 mM DETC and 5 mM PTU (94 and 77% inhibition, respectively), and also significantly inhibited by 8 mM tropolone, 1 mM SHAM, and 1 mM CTAB (56, 33, and 21% inhibition, respectively). The catecholase inhibitor 4-HR (1 mM) exerted 34 % inhibition.

Results with PPD as substrate are summarized in Fig. 4. Autoxidation was suppressed by DETC (0.5 mM, Fig. 4a). Therefore, DETC was not used for further studies. Tropolone (8 mM) and the laccase inhibitor CTAB (1 mM) only slightly interfered (stimulation) with

the autoxidation of PPD. Since CTAB is the better documented inhibitor of laccase, we decided to maintain it in the study. Interestingly, Fig. 4b shows that enzymatic oxidation was strongly inhibited by CTAB (1 mM). Moreover, the PO inhibitor PTU (0.5 and 5 mM) exerted 100% inhibition. Taken together, these results confirm the presence of a PO-like activity in *C. gigas* and suggest the presence of a catecholase-like and/or a laccase-like activity in plasma.

3.5. PO-like activity in protein fractions

Independently of the substrate, specific PO-like activity was considerably higher in hemocyte lysate supernatant (HLS) than in plasma (Fig. 5). Moreover, the results obtained with precipitated protein fractions confirm that the activities measured derived from a protein source. Results with precipitated protein fractions from plasma are summarized in Fig. 5a,c. With dopamine as substrate (Fig. 5a), the PO inhibitor PTU (5 mM) and the catecholase inhibitor 4-HR (1 mM), inhibited PO-like activity by 57 and 26%, respectively. In contrast to the results obtained with crude plasma, the laccase inhibitor CTAB (1 mM) did not exert inhibition in precipitated protein fractions from plasma. With PPD as substrate (Fig. 5c), PTU and CTAB exerted 100% inhibition of PO-like activity.

Results with precipitated protein fractions from HLS are summarized in Fig. 5b,d. With dopamine as substrate (Fig. 5b), PTU and CTAB inhibited PO-like activity by 57 and 100%, respectively. Interestingly, with PPD as substrate (Fig. 5d), PTU and CTAB exerted 90 and 100% inhibition, respectively.

4. Discussion

Most studies on PO from *C. gigas* have been performed with L-DOPA. However, this common substrate for the three classes of POs, i.e. tyrosinases, catecholases and laccases, was not appropriate to discriminate between these three classes of POs. Therefore, in the present work, various concentrations of different substrates were used for identifying the endogenous PO-like activity in hemolymph from this bivalve.

Oxidation catalyzed by POs requires O₂. However, PO substrates are also readily autoxidized in contact with air [15, 29]. Therefore, a special attention should be paid to substrate autoxidations before studying PO activity. Using both spectrophotometry and oxygraphy, we confirmed that L-DOPA, dopamine, and to a lesser extent PPD, could be readily autoxidized. These non-enzymatic oxidation reactions probably involve quinone redox cycling leading to the formation of different types and quantities of oxygen radicals and quinone-derived products [30].

Another constraint for studying PO is the possible interference between PO inhibitors and non-enzymatic autoxidation. For instance, the PO inhibitor 2-ME is also a well-known reducing agent (Table 1), that may react with the substrate and/or the quinone intermediates derived from the autoxidation reaction. We systematically examined the effects of various PO inhibitors on substrate autoxidations. We found that 2-ME (5 mM), NaN₃ (0.1-1 mM) and DETC (5 mM) interfered with dopamine autoxidation, and that DETC (0.5 mM) interfered with PPD autoxidation. 2-ME probably acts as a reducing

agent while NaN_3 and DETC might possibly act as direct free radical scavengers [31, 32]. These inhibitors (at the concentrations used) should therefore be avoided for identifying PO activity.

We focused on PO-like activity from crude plasma. By using both spectrophotometry and oxygraphy, PO-like activity was detected in the presence of *o*-diphenols (L-DOPA, dopamine), suggesting the presence of a catecholase- or laccase-like activity (Table 2, Fig. 1). Interestingly, the Km_{app} value for L-DOPA calculated in the current study was similar to values previously described in hemocytes of *S. glomerata* and *C. virginica* [16, 33]. Importantly, results with the laccase substrate PPD suggest the presence of a laccase-like activity never reported before in this organism. However, at this stage, it remains uncertain whether the dopamine oxidation activity is the result of the functioning of a mixture of laccase and catecholase or of a single laccase. We next attempted to clarify this issue using moderate concentrations of PO inhibitors. With dopamine as substrate, PO-like activity was partially inhibited by the catecholase inhibitor 4-HR and the laccase inhibitor CTAB. With PPD as substrate, PO-like activity was fully inhibited by CTAB. These data suggest that both catecholase and laccase are present in the plasma of *C. gigas*.

Most of the PO inhibitors listed in Table 1 are copper chelators and constitute therefore potential catecholase and laccase inhibitors [34-37]. Accordingly, we found that PO-like activity from plasma was inhibited by PTU, DETC, and to a lesser extent, by SHAM and tropolone. PTU was previously described as an inhibitor of tyrosinases and catecholases [38] but also as an inhibitor of laccases [25, 39]. It contains a sulphur compound that binds copper at the active site of catecholase [40]. We found that PTU strongly inhibited dopamine and PPD oxidation suggesting that it can inhibit both catecholase and laccase. To the best of our knowledge, the following chemical products have been reported in the literature as laccase inhibitors : *N*-hydroxyglycine [35], NaN_3 [35], ammonium tetramolybdate [41], SHAM [35], kojic acid [35] and CTAB [42-44]. We did not use *N*-hydroxyglycine because, at μM concentrations, *N*-hydroxyglycine was shown to bleach solutions of substrates oxidized either chemically or enzymatically by laccase [45]. For NaN_3 (Fig. 2) and ammonium tetramolybdate (data not shown), an effect was observed on the autoxidation of, at least, one laccase substrate. SHAM and kojic acid are PO inhibitors but not laccase specific [37, 46]. Therefore, although CTAB is also known as a cationic detergent, it appeared to be the most pertinent laccase inhibitor. Indeed, CTAB was the only molecule reported as a specific inhibitor of laccase but not other phenoloxidases [42-44], and we confirmed that it did not affect autoxidation of laccase substrates.

Several difficulties are encountered when identification of a PO-like activity is performed in a non purified or in a partially purified tissue homogenate because substrates used by PO may be used by (i) peroxidases (ii) hemocyanins, (iii) cytochrome oxidases (EC 1.9.3.1) and (iv) ceruloplasmines or ferroxidases (EC 1.16.3.1). Oxygraphic data showed the involvement of true oxidase activities in plasma (Fig. 1). The involvement of peroxidases [47] was excluded since exogenous catalase did not inhibit dopamine and PPD oxidation activities. It should be noted that, with dopamine as substrate, catalase induced a two-fold increase of PO-like activity. This could be explained by the generation of H_2O_2 as an auto-inhibitor of PO during dopamine oxidation [48]. Hemocyanins, cytochrome oxidases,

and ceruloplasmins are absent in the plasma and in the HLS obtained from *C. gigas* [49-52]. Therefore, only PO-like activity was detected in crude plasma.

In order to confirm that PO-like activity observed in crude plasma was unambiguously due to a protein source, the next step was to partially purify fractions from plasma. Our data obtained with precipitated protein fractions confirmed that the signal measured was from a protein source (Fig. 5). The results obtained with dopamine and PPD as substrates and with PTU (5 mM), 4-HR (1 mM) and CTAB (1 mM) as inhibitors confirmed the presence of a catecholase-like and a laccase-like activity in plasma (Fig. 5a,c). Precipitated protein fractions from HLS were tested for PO-like activity with the aim to localize endogenous PO-like activity in hemolymph from *C. gigas*. Independently of the substrate, specific PO-like activity was considerably higher in hemocyte lysate supernatant (HLS) than in plasma (Fig. 5). In addition, we found that catecholase-like activity was absent in the HLS while a high laccase-like activity was detected in this fraction (Fig. 5b,c). Therefore, the type of PO-like activity that can be detected depends on the hemolymphatic compartment that is studied, i.e. (i) two types of PO-like activity can be detected in plasma (catecholase and laccase), and (ii) one type of PO-like activity can be detected in HLS (laccase).

It is important to notice that, with dopamine as substrate, CTAB inhibited 21% of PO-like activity in crude plasma samples, suggesting the presence of a laccase in the plasma of *C. gigas*. However, this inhibitory effect was suppressed in precipitated protein fractions. Thus, results with crude plasma suggest that (i) a parasitic reaction (even minor) is measured in parallel with the enzymatic dopamine oxidation and that (ii) this parasitic reaction is suppressed when proteins are precipitated. This confirms the interest of this purification step for identification of PO-like activity.

POs are an important component in immune defence mechanisms in bivalves. For example, the importance of phenoloxidase activity in the resistance to *M. sydneyi* has been reported in *S. glomerata* [17]. Besides, the presence of laccases has previously been evoked in molluscs [16, 53]. Moreover, a gene encoding a laccase was recently identified from Pacific oyster, *C. gigas*, hemocytes (Faury and Renault, pers. comm.) and its total sequence deposited in GenBank under accession n° NCBI ID: EU678320. This gene was shown to be over-expressed in the presence of polyaromatic hydrocarbons, suggesting a potential use of laccase as a biomarker of pollution exposure [54]. In this context, the present study demonstrates, for the first time through the use of a panel of POs substrates and inhibitors, that a laccase-like activity is present in a mollusc species, the Pacific oyster, *C. gigas*. A better characterization of laccase and/or catecholase systems would help to extend our knowledge on immune defence mechanisms in *C. gigas*, and thus, would improve our ability to monitor and manage the production and survival of this important species.

Acknowledgments

This study was supported by a PhD grant from the Conseil Général of the Charente-Maritime for A. Luna-Acosta. The Conseil Régional de Poitou-Charentes is acknowledged for financial support through the research project 'POLERON' (Modifications chimiques

de polluants organiques dans le bassin de Marennes-Oléron, toxicité des produits de dégradation sur l'huître creuse).

References

- [1] Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Canovas F, Garcia-Carmona F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1247:1-11.
- [2] Chase MR, Raina K, Bruno J, Sugumaran M. Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidases from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2000;30:953-67.
- [3] Rodriguez-Lopez JN, Tudela J, Varon R, Garcia-Carmona F, Garcia-Canovas F. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J Biol Chem*. 1992;267:3801-10.
- [4] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:23-8.
- [5] Asokan R, Arumugam M, Mullainadhan P. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Dev Comp Immunol*. 1997;21:1-12.
- [6] Alan R, Ezekowitz B, Hoffmann J. Innate immunity: The blossoming of innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:9-11.
- [7] Claus H, Decker H. Bacterial tyrosinases. *System Appl Microbiol*. 2006;29:3-14.
- [8] Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev*. 1996;96:2563-606.
- [9] Rescigno A, Zucca P, Flurkey A, Inlow J, Flurkey WH. Identification and discrimination between some contaminant enzyme activities in commercial preparations of mushroom tyrosinase. *Enzyme Microb Technol*. 2007;41:620-7.
- [10] Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Soc Gen Microbiol*. 1994;140:19.
- [11] Coles JA, Pipe RK. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol*. 1994;4:337-52.
- [12] Carballal MJ, Lopez C, Azevedo C, Villalba A. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytillus galloprovincialis*. *J Invertebr Pathol*. 1997;70:96-105.
- [13] Lopez C, Carballal MJ, Azevedo C, Villalba A. Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: bivalvia). *Fish Shellfish Immunol*. 1997;7:595-608.
- [14] Asokan R, Arumugam M, Mullainadhan P. Functional analysis of plasma prophenoloxidase system in the marine mussel *Perna viridis*. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol*. 1998;120:753-62.
- [15] Luna-Gonzalez A, Maeda-Martinez AN, Vargas-Albores F, Ascencio-Valle F, Robles-Mungaray M. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol*. 2003;15:275-82.
- [16] Jordan PJ, Deaton LE. Characterization of phenoloxidase from *Crassostrea virginica* hemocytes and the effect of *Perkinsus marinus* on phenoloxidase activity in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Geukensia demissa*. *J Shellfish Res*. 2005;24:477-82.
- [17] Peters R, Raftos DA. The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture*. 2003;223:29-39.
- [18] FAO. Aquaculture Production: Quantities 1950-2002. *Fishstat Plus*; 2005.
- [19] Cheney DP, MacDonald BF, Elston RA. Summer mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington. *J Shellfish Res*. 2000;19:353-9.
- [20] Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert M, Nicolas JL. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb Ecol*. 2007;53:187-96.

- [21] Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T. *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 2004;16:501-12.
- [22] Bado-Nilles A, Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Le Floch S, Renault T. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicol in Vitro.* 2008;22:1610-7.
- [23] Hellio C, Bado-Nilles A, Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol.* 2007;22:433-40.
- [24] Fenoll LG, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, Tudela J. Unification for the expression of the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *IUBMB Life.* 2002;54:137-41.
- [25] Hattori M, Konishi H, Tamura Y, Konno K, Sogawa K. Laccase-type phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *J Insect Physiol.* 2005;51:1359-65.
- [26] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano M, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76-85.
- [27] Rosenfeld E, Duport C, Zigha A, Schmitt P. Characterisation of aerobic and anaerobic growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73. *Can J Microbiol.* 2005;51:149-58.
- [28] Zar JH. *Biostatistical analysis.* 2d ed. New Jersey, USA: Prentice Hall; 1984.
- [29] Hermann TE, Kurtz MB, Champe SP. Laccase localized in hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol.* 1983;154:955-64.
- [30] Guillen F, Martinez MJ, Muñoz C, Martinez AT. Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. *Arch Biochem Biophys.* 1996;339:190-9.
- [31] Sagone AL Jr, Mendelson DS, Metz EN. The effect of sodium azide on the chemiluminescence of granulocytes - evidence for the generation of multiple oxygen radicals. *J Lab Clin Med.* 1977;339:190-9.
- [32] Liu J, Shigenaga MK, Yan LJ, Mori A, Ames BN. Antioxidant activity of diethyldithiocarbamate. *Free Radical Res.* 1996;24:461-72.
- [33] Aladaileh S, Rodney P, Nair SV, Raftos DA. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol.* 2007;148:470-80.
- [34] Ögel ZB, Yüzügüllü Y, Mete S, Bakir U, Kaptan Y, Sutay D, et al. Production, properties and application to biocatalysis of a novel extracellular alkaline phenol oxidase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;71:853-62.
- [35] Faure D, Bouillant ML, Bally R. Comparative study of substrates and inhibitors of *Azospirillum lipoferum* and *Pyricularia oryzae* laccases. *Appl Env Microbiol.* 1995;61:1144-6.
- [36] Decker H, Jaenicke E. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Dev Comp Immunol.* 2004;28:673-87.
- [37] Perez-Gilabert M, García-Carmona F. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *J Agr Food Chem.* 2000;48:695-700.
- [38] Dittmer NT, Suderman RJ, Jiang H, Zhu YC, Gorman MJ, Kramer KJ, et al. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004;34:29-41.
- [39] Arias ME, Arenas M, Rodriguez J, Soliveri J, Ball AS, Hernandez M. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl Env Microbiol.* 2003;69:1953-8.

- [40] Gerdemann C, Eicken C, Krebs B. The crystal structure of catechol oxidase: New insight into the function of type-3 copper proteins. *Acc Chem Res.* 2002;35:183-91.
- [41] Flurkey A, Cooksey J, Reddy A, Spoonmore K, Rescigno A, Inlow J, et al. Enzyme, protein, carbohydrate, and phenolic contaminants in commercial tyrosinase preparations: potential problems affecting tyrosinase activity and inhibition studies. *J Agr Food Chem.* 2008;56:4760-8.
- [42] Walker JRL, McCallion RF. The selective inhibition of *ortho*- and *para*-diphenol oxidases. *Phytochemistry.* 1980;19:373-7.
- [43] Mazzafera P, Robinson SP. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. *Phytochemistry.* 2000;55:285-96.
- [44] Martinez-Alvarez O, Montero P, Gomez-Guillen C. Evidence of an active laccase-like enzyme in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Food Chem.* 2008;108:624-32.
- [45] Zhang J, Kjonaas R, Flurkey WH. Does N-hydroxyglycine inhibit plant and fungal laccases? *Phytochemistry.* 1999;52:775-83.
- [46] Zhang X, Flurkey WH. Phenoloxidases in *Portabella* mushrooms. *J Food Sci.* 1997;62:97-100.
- [47] Christensen BM, Li J, Chen CC, Nappi AJ. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends Immunol.* 2005;21:192-9.
- [48] Muñoz-Muñoz JL, Garcia-Molina F, Varon R, Tudela J, Garcia-Canovas F, Rodriguez-Lopez JN. Generation of hydrogen peroxide in the melanin biosynthesis pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1794:1017-29.
- [49] Eble A, Kennedy VS, Newell RIE. The eastern oyster *Crassostrea virginica*. College Park, MD, USA: Maryland Sea Grant Book; 1996.
- [50] Lannig G, Cherkasov AS, Pörtner HO, Bock C, Sokolova IM. Cadmium-dependent oxygen limitation affects temperature tolerance in eastern oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin). *Am J Physiol.* 2008;294:1338-46.
- [51] Schosinsky KH, Lehmann HP, Beeler MF. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. *Clin Chem.* 1974;20:1556-63.
- [52] Kawai K. The cytochrome system in marine lamellibranch tissues. *Biol Bull.* 1959;117:125-32.
- [53] Bedouet L, Marie A, Dubost L, Peduzzi J, Duplat D, Berland S, et al. Proteomics analysis of the nacre soluble and insoluble proteins from the oyster *Pinctada margaritifera*. *Mar Biotechnol.* 2007;9:638-49.
- [54] Bado-Nilles A, Le Floch S, Renault T, Faury N, Auffret M, Quentel C, et al. Effects of two oils on immune parameters and on the expression of immune related genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Physiomed.* 2008.
- [55] Johannes C, Majcherczyk A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J Biotechnol.* 2000;78:193-9.
- [56] Zufelato MS, Lourenço AP, Simões LP, Jorge JA, Bitondi MM. Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004;34:1257-68.
- [57] Lee JL, Kong KH, Cho SH. Purification and characterization of tyrosinase from *Solanum melongena*. *J Biochem Mol Biol.* 1997;30:150-6.
- [58] Shatta A, Ei-Shamei Z. Differentiation of eggplant (*Solanum melongena*) polyphenoloxidase, laccase and peroxidase using selective substrates and inhibitors. *Adv Food Sci.* 1999;21:79-83.
- [59] Zavarzina AG, Zavarzin AA. Laccase and tyrosinase activities in lichens. *Microbiology.* 2006;75:546-56.
- [60] Dawley RM, Flurkey WH. Differentiation of tyrosinase and laccase using 4-hexylresorcinol, a tyrosinase inhibitor. *Phytochemistry.* 1993;33:281-4.

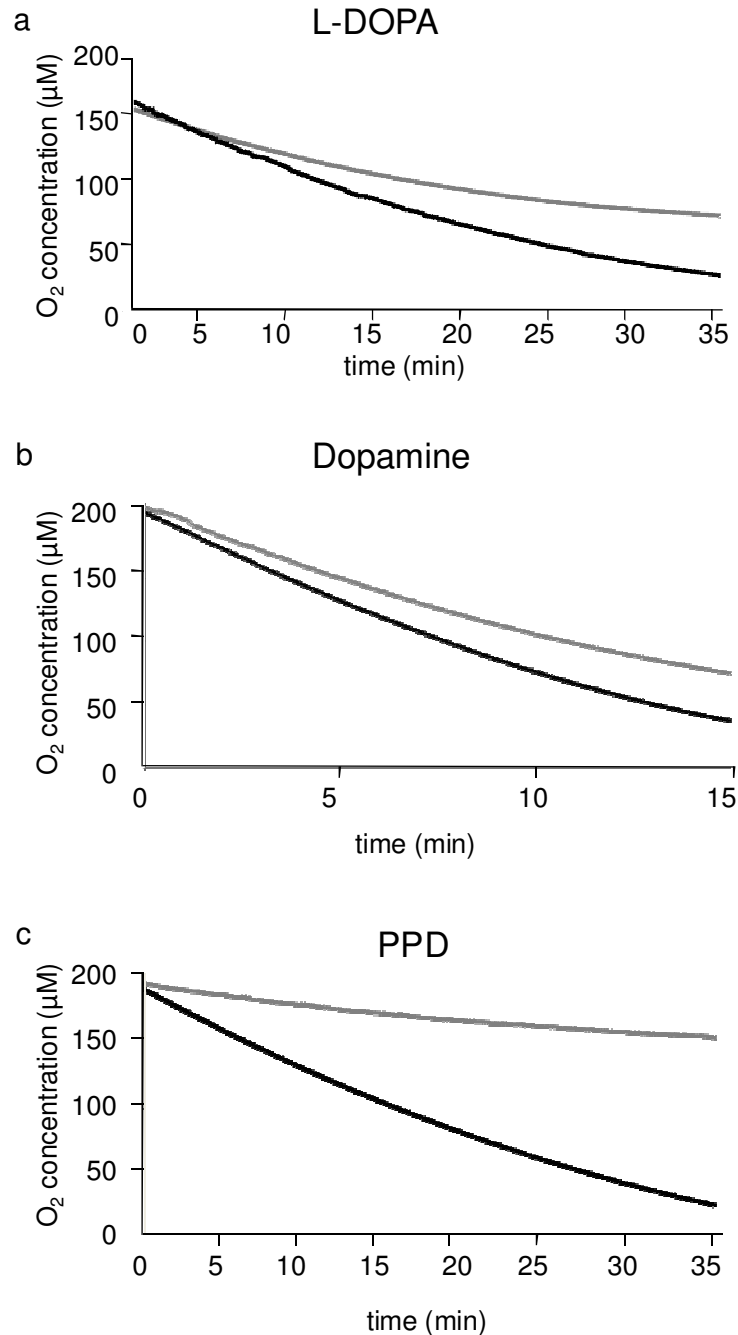


Figure 1 Oxygen uptake during oxidation of PO substrates. Non-enzymatic (- plasma, gray lines) and enzymatic (+ plasma, black lines) oxidation reactions were followed using oxygraphy with the substrates: (a) L-DOPA 10 mM, (b) dopamine 100 mM, and (c) PPD 50 mM. Experiments were repeated three times for each substrate. For clarity, only one typical experiment is shown. No oxygen uptake was observed in 'buffer' and 'sample' controls (data not shown).

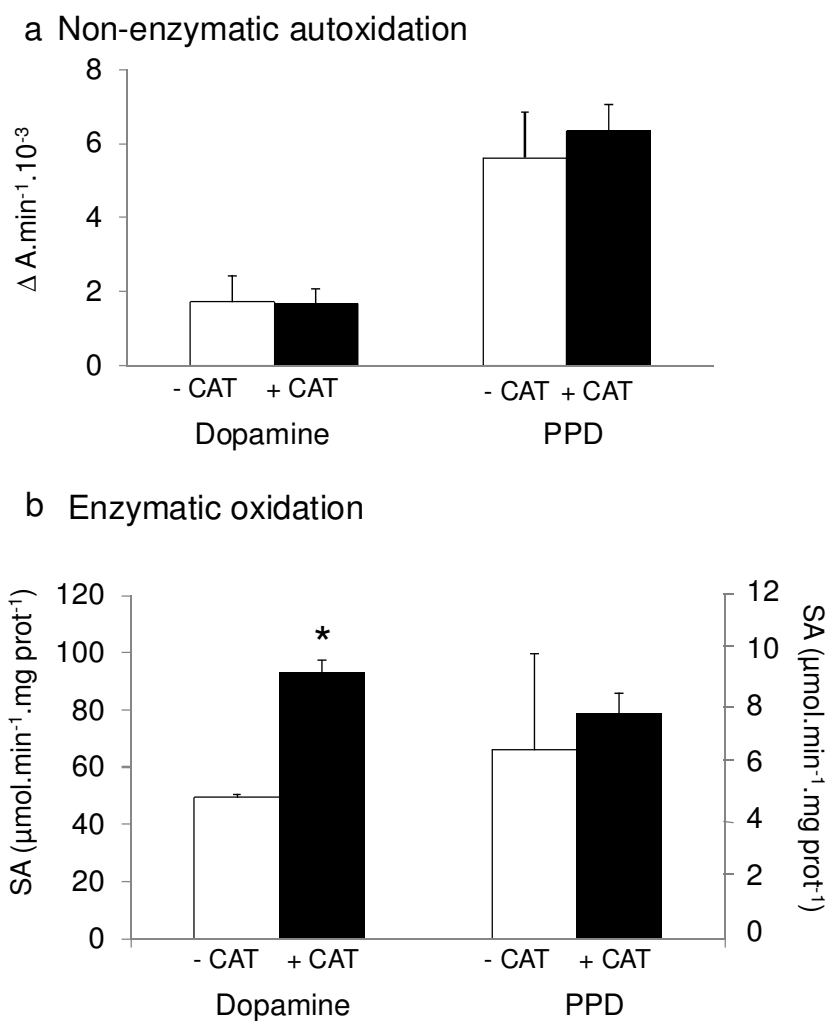


Figure 2 Effect of catalase on autoxidation (a) and PO-like activity (b). Both dopamine and PPD were used as substrates in the presence (+ CAT) or in the absence (- CAT) of catalase. Left y axis corresponds to results obtained with dopamine +/- CAT and right y axis corresponds to results obtained with PPD +/- CAT. Mean \pm SD $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$, $n = 9$, *statistical difference for $p < 0.05$.

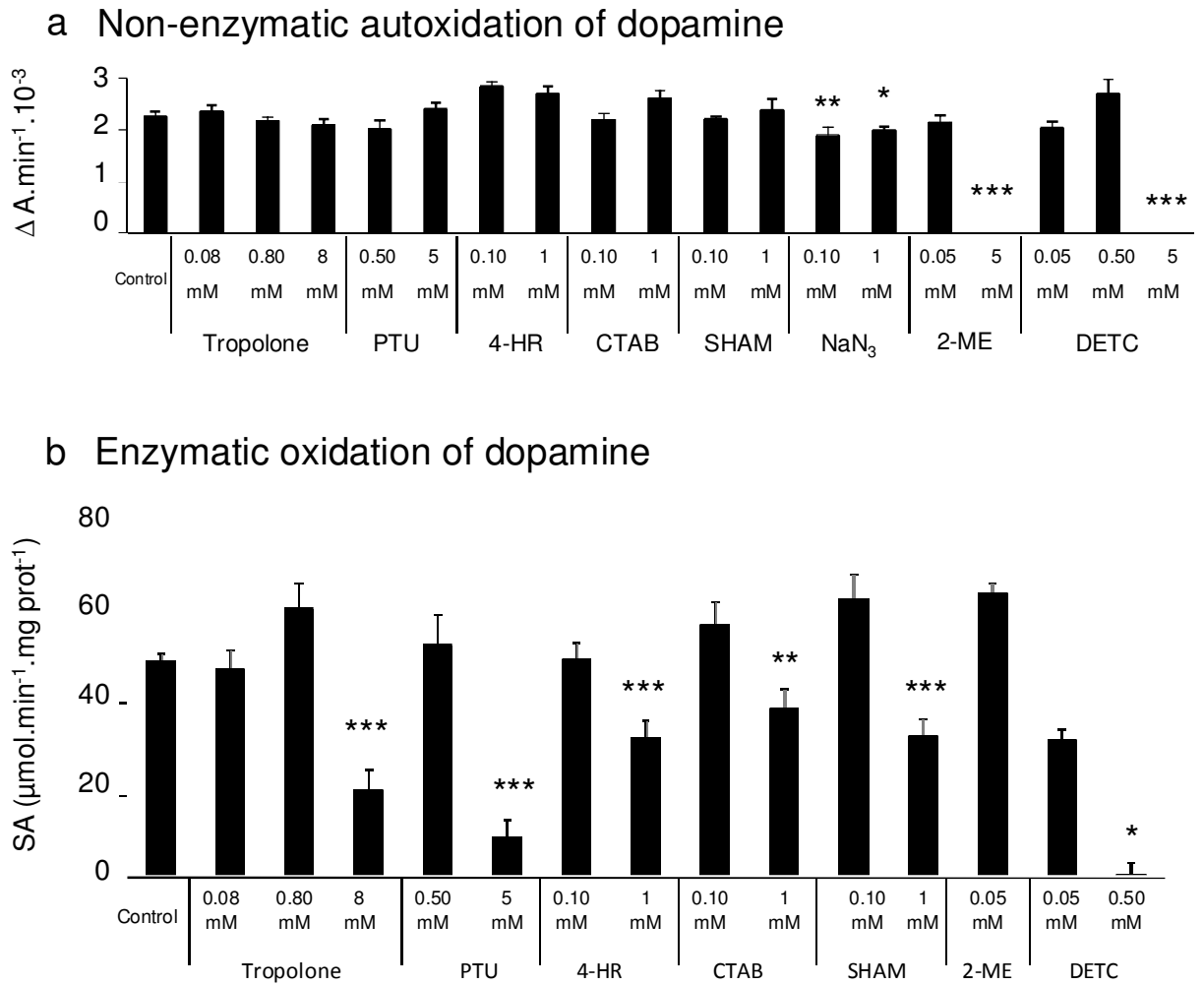
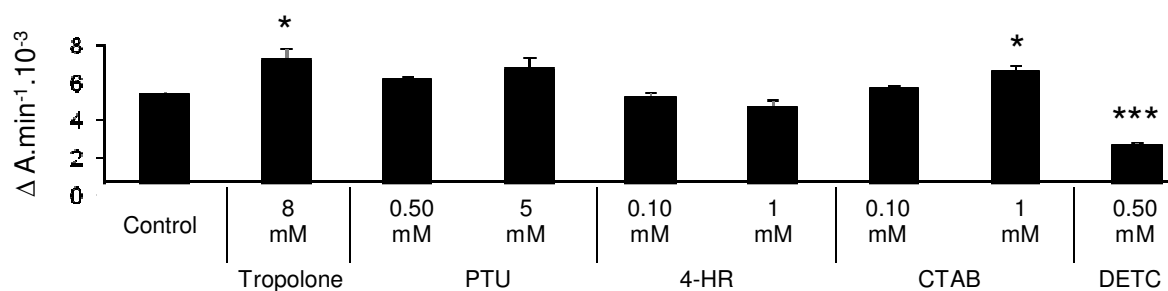


Figure 3 Effect of inhibitors on autoxidation and enzymatic oxidation of dopamine. (a) Non-enzymatic autoxidation (without plasma). (b) Enzymatic oxidation (with plasma). 'Control' corresponds to the condition without inhibitor. PO inhibitor concentrations correspond to final concentrations in the assay. Mean \pm SD $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$, $n = 9$, *statistical difference of $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, respectively.

a Non-enzymatic autoxidation of PPD



b Enzymatic oxidation of PPD

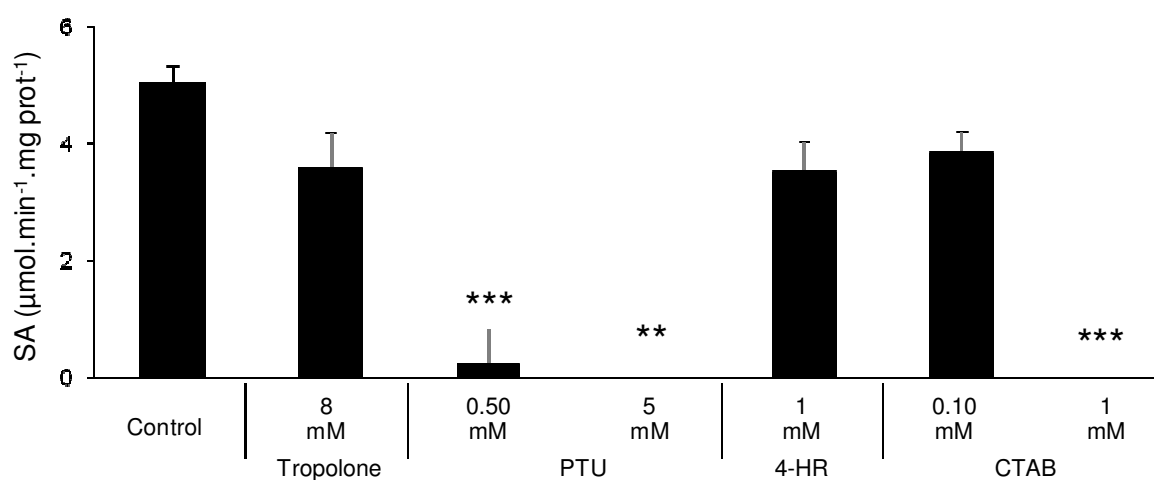


Figure 4 Effect of inhibitors on autoxidation and enzymatic oxidation of PPD.(a) Non-enzymatic autoxidation.(b) Enzymatic oxidation. 'Control' corresponds to the condition without inhibitor. PO inhibitor concentrations correspond to final concentrations in the assay. Mean \pm SD $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$, $n=9$, *statistical difference for $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, respectively.

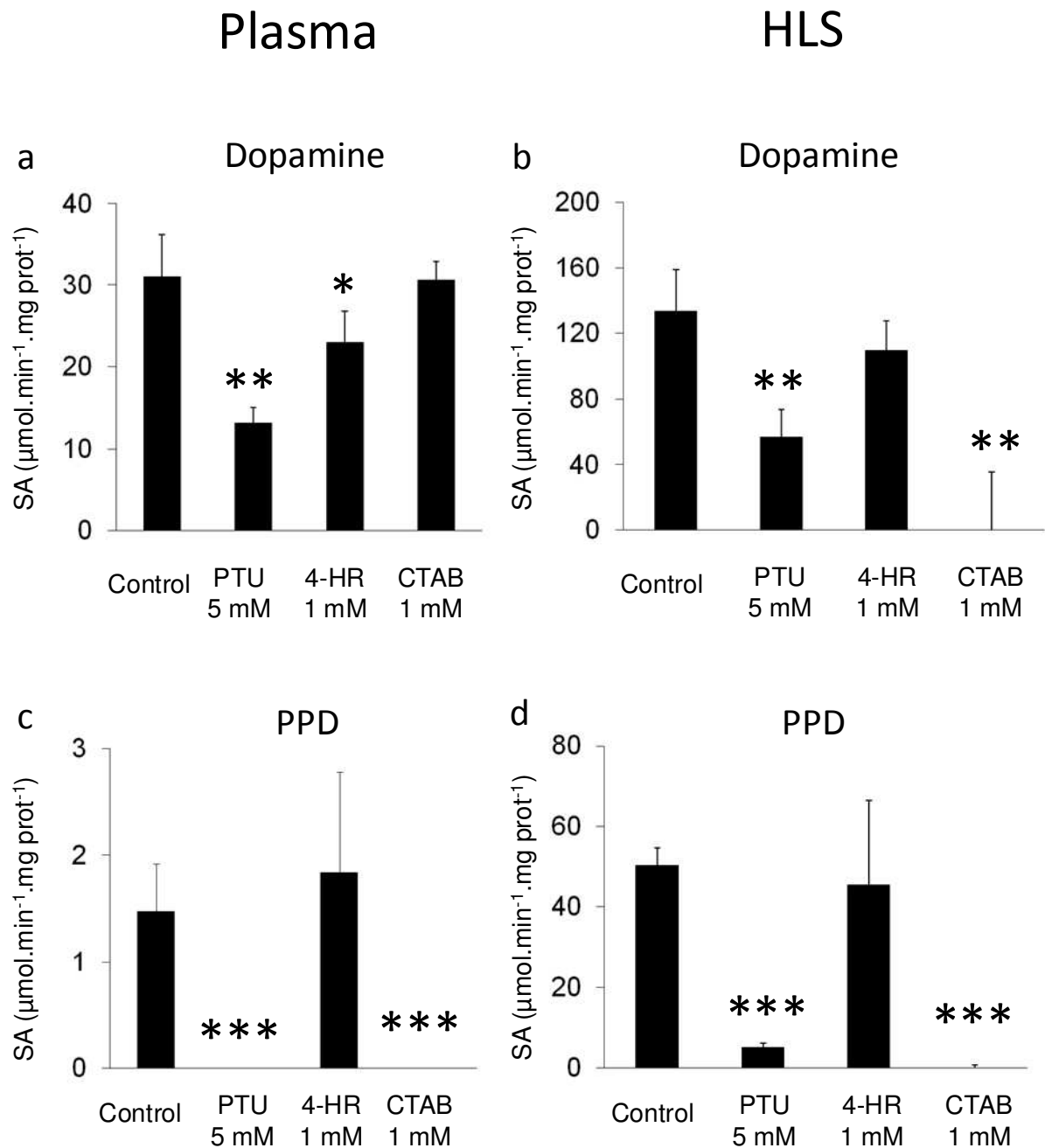


Figure 5 Inhibition of phenoloxidase-like activity in precipitated protein fractions from plasma and hemocyte lysate supernatant (HLS). Both dopamine (a, b) and PPD (c, d) were used as substrates. 'Control' corresponds to the condition without inhibitor. PO inhibitor concentrations correspond to final concentrations in the assay. Mean \pm SD $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$, $n = 9$, *statistical difference for $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, respectively.

Table 1 Phenoloxidase-like inhibitors and modes of action. DETC: diethyldithiocarbamate; PTU: 1-phenyl-2-thiourea; 2-ME: 2-mercaptoethanol; NaN_3 : sodium azide; 4-HR: 4-Hexylresorcinol; SHAM: salicylhydroxamic acid; CTAB: cetyl trimethyl ammonium bromide.

Inhibitor	Mode of action	Reference
DETC ^{1,2,3}	Copper chelation (competitive inhibition)	[16, 55]
PTU ^{1,2,3}	Copper chelation (competitive inhibition): sulphur binds to copper at the active site of the enzyme, blocking accessibility of the substrate	[39, 56]
Tropolone ^{1,2,3}	Substrate of peroxidases and inhibitor of POs (copper chelation)	[35, 56]
2-ME ^{1,2,3}	Reducing agent: sulphur containing compounds are quinone chelators, blocking their participation in secondary reactions of melanization and/or acting directly with the enzyme	[57, 58]
NaN_3 ^{1,2,3}	Metal chelator: inhibitor of all types of POs	[35, 59]
4-HR ^{1,2}	Fixation on the active site: competitive inhibitor of tyrosinases and catecholases but not of laccases	[59, 60]
SHAM ^{1,2}	Metal chelator described as an inhibitor of alternative oxidases in plants: competitive inhibitor of tyrosinases and catecholases but not of laccases	[35, 60]
Kojic acid ^{1,2,3}	Competitive or mixed-type inhibitor of POs	[35, 37, 41, 46]
CTAB ³	Cationic detergent: competitive or non competitive inhibitor of laccases, but not of other POs	[42-44]

¹ Tyrosinase inhibitor

² Catecholase inhibitor

³ Laccase inhibitor

Table 2 Identification of phenoloxidase-like activity in plasma of *Crassostrea gigas* by using a panel of substrates. ∅, no PO-like activity detected.

Type of substrate	Substrate	• (nm) ⁴	Final substrate concentrations tested (mM)	Substrate saturating concentration (mM)	Km_{app} (mM)	Vm_{app} (•A min ⁻¹ .10 ⁻³)
Monophenol ¹	L-tyrosine	490	4, 6, 8, 10, 20	∅	∅	∅
	4-HA	490	4, 6, 8, 10, 20	∅	∅	∅
	PHPPA	490	4, 6, 8, 10, 20	∅	∅	∅
<i>o</i> -Diphenol ^{1,2,3}	L-DOPA	490	4, 6, 8, 10, 20	8	7	0.45
	Dopamine	490	10, 25, 50, 100, 200	100	51	0.51
	DHPPA	400	4, 6, 8, 10, 20	∅	∅	∅
Metoxi phenol ³	Syringaldazine	525	0.01, 0.1, 1	∅	∅	∅
Non-phenolic substrates ³	ABTS	420	1, 2, 3, 4, 5	∅	∅	∅
	PPD	420	5, 10, 25, 50, 100	50	45	0.59

¹Tyrosinase substrate, in Tris buffer

²Catecholase substrate, in Tris buffer

³Laccase substrate, in methanol

⁴Wavelengths used to measure by spectrophotometry the formation of each *o*-quinone derivative

Annexe 3 : Characterization of tissue-specific phenoloxidase activities in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Characterization of tissue-specific phenoloxidase activities in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Andrea Luna-Acosta*, Hélène Thomas-Guyon, Myriam Amari, Eric Rosenfeld, Paco Bustamante, Ingrid Fruitier-Arnaudin

Affiliations

Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

* **Corresponding author:** A. Luna-Acosta / I. Fruitier-Arnaudin

Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs)
UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle
2 rue Olympe de Gouges, F-17042 La Rochelle Cedex 01,
France

E-mail : aluna1508@yahoo.com / ifruitie@univ-lr.fr

Tel : +33 ASCI ENCE 5 46 50 76 48 / +33 (0)5 46 45 85 62

Fax : +33 (0)5 46 50 76 63

Abstract

Phenoloxidases (POs, EC 1.14.18.1) play a key role in melanin production and are involved in invertebrate immune mechanisms. They have been detected in the tissues from different bivalves. Recently, we identified catecholase- and laccase-like PO activities in the plasma and in the haemocyte lysate supernatant (HLS) of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. To go further in our investigations, the aims of this study were (i) to determine the tissue distribution of PO activities in *C. gigas*, and (ii) to precise the type(s) of POs (i.e. tyrosinase, catecholase and laccase) involved in these activities. With dopamine and p-phenylenediamine (PPD) but not with L-tyrosine used as substrates, different protein bands were detected on polyacrylamide gels, revealing differences in molecular weight and substrate affinity between POs of each tissue. Moreover, PO-like activities were all inhibited by 1-phenyl-2-thiourea (PTU) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), confirming the presence of catecholase- and laccase-like activities in *C. gigas*. Interestingly, protein identification by mass spectrometry and protein database searches revealed that the peptides extracted from lower bands of the mantle and the HLS samples were homologous to cavortin, a superoxide dismutase-like protein from *C. gigas*. Results of this study could be used as tools for immunological and immunotoxicological studies and bring insights into the role played by cavortin in this marine organism.

Key Words: mollusc - laccase – catecholase - cavortin - superoxide dismutase

1. Introduction

Phenoloxidasases (POs, EC 1.14.18.1) are a family of copper proteins widely distributed in bacteria, fungi, plants and animals [1]. They play a key role in melanin production and are implicated in immune defence mechanisms in invertebrates. This family of enzymes include tyrosinases (EC 1.14.18.1), catecholases (EC 1.10.3.1) and laccases (EC 1.10.3.2), all capable of o-diphenol oxidation. However, among these three enzymes, only tyrosinases can hydroxylate monophenols (e.g. L-tyrosine), and only laccases can oxidise p-diphenols and aromatic compounds containing amine groups (e.g. p-phenylenediamine) [2, 3]. In addition to that, a panel of inhibitors exert different actions in these three types of enzymes: while 1-phenyl-2-thiourea (PTU) inhibits the three types of PO activities [4, 5], cethyltrimethylammonium bromide (CTAB) specifically inhibits laccase activity [6]. Recently, we conducted a study to identify POs activities present in the hemolymph of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1753) [7]. Our interest in *C. gigas* comes from the fact that this organism dominates over all other molluscs with respect to global distribution and aquaculture production, but suffers from massive summer mortality each year [8]. Summer mortality of *C. gigas* has been suggested to be the result of a complex interaction between the host, pathogens and environmental factors [8]. Importantly, studies in *C. gigas* have shown that the PO activities can be modulated by environmental factors, such as the presence of heavy metals or hydrocarbons [9-11]. In addition to that, a gene coding for a laccase in the hemocytes from *C. gigas* has shown to be modulated in the presence of hydrocarbons [12]. To the best of our knowledge, studies on POs in *C. gigas* have only been carried out in the hemolymphatic compartment. However, POs may be present in other body tissues in bivalves, e.g. in the prismatic shell layer [13] or in the byssus gland [14]. A better characterisation and localisation of POs in *C. gigas* is needed to expand our knowledge on the immune defence mechanisms in this organism and therefore to a better understanding of the potential causes of summer mortality events.

In this general context, our goal was to determine the distribution of PO activities (tyrosinase, catecholase, and laccase) in different oyster body compartments, i.e. the gills, the digestive gland, the mantle, the muscle, the plasma and the hemocyte lysate supernatant (HLS). PO activities were determined by spectrophotometry using different PO substrates (L-tyrosine, dopamine and p-phenylenediamine) and PO inhibitors (phenylthiourea, cethyltrimethylammonium molybdate). Moreover, electrophoretic techniques using polyacrylamide gels are useful to detect PO enzymes and their associated molecular weights in crude extracts without the necessity of enzyme purification [15-18]. Hence, an electrophoretic analysis of POs was carried out on crude and partially purified samples from the different oyster compartments. Protein bands that were associated to PO activities were analysed by mass spectrometry and compared with sequence databases. The presence of a cavortin in the mantle and in the hemocytes is discussed.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and materials

L-tyrosine, dopamine, p-phenylenediamine (PPD), 1-phenyl-2-thiourea (PTU), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH), trizma hydrochloride (Tris HCl), sodium chloride (NaCl), ammonium sulfate (AS), sodium dodecyl sulfate (SDS), trizma base, glycine, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), ammonium persulfate, glacial acetic acid, Coomassie brilliant blue, bovine serum albumin (BSA), copper sulfate and bicinchoninic acid were obtained from Sigma-Aldrich (France). Magnesium chloride (MgCl₂) and calcium chloride (CaCl₂) were obtained from Acros organics (France). Acrylamide/Bis acrylamide 30% was obtained from Bio-Rad.

2.2. Oysters

Three years old Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (n= 30; mean ± SD; weight: 75.5 ± 8.7 g; length: 9 ± 3 cm) were purchased during October-November 2008 from shellfish farms in Aytré Bay (Charente Maritime, France), on the French Atlantic coast, and were processed immediately after their arrival in the laboratory.

2.3. Collection of oyster tissues

Plasma • After opening the oyster shells by cutting off the adductor muscle, a quantity (0.5-1 ml) of hemolymph was withdrawn directly from the pericardial cavity with a 1-ml syringe equipped with a needle (0.9 x 25 mm), and the hemolymph from 10 oysters was pooled to reduce inter-individual variation [19]. Hemolymph samples were centrifuged (260 g, 10 min, 4°C) to separate the cellular fraction (i.e. hemocytes) from plasma [20]. Aliquots (100 µl) were stored at -80°C. Each aliquot was used only once.

Hemocyte lysate supernatant • Hemocytes were homogenized at 4°C in Tris buffer (0.1 M Tris HCl, 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂ and 10 mM CaCl₂) adjusted to pH 7. They were lysed using a Thomas-Potter homogenizer (IKA-Labortechnik, clearance 0.13-0.18mm) at 200 rpm for 1 min, and centrifuged at 10 000g for 10 min at 4°C. The resulting hemocyte lysate supernatant (HLS) was collected for enzymatic studies. Aliquots (100 µl) were stored at -80°C. Each aliquot was used only once.

Tissues • Pooled gills, digestive glands, mantles and muscles of 10 oysters were used for each replicate sample, and 3 replicates were prepared per tissue. Gills, digestive gland, mantle and muscle were removed from oysters, homogenized at 4°C with Tris buffer, using an Ultra Turrax (T25 basic, IKA-WERKE) and a Thomas-Potter homogenizer (IKA-Labortechnik RW 20.n, size 0.13-0.18mm, BB), and centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C. The resulting supernatants were collected for enzymatic studies. Aliquots (100 µl) were stored at -80°C. Each aliquot was used only once.

2.4. Partial purification

A previous analysis, by using different concentrations of saturated ammonium sulfate (0, 30, 40, 60, 70, 80, 100%), revealed that precipitation with 60% saturated ammonium sulfate (60P-SAS) was the best condition for protein concentration to detect PO-like

activity (data not shown) and was in agreement with other studies [21, 22]. Therefore, proteins of collected supernatants were brought to 60% saturation concentration by addition of solid ammonium sulfate at 4°C, and allowed to stand overnight. The resulting precipitate was collected by centrifugation (15 500 g for 10 min), dissolved in a small volume of Tris buffer (0.1 M Tris HCl, 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂ and 10 mM CaCl₂) adjusted to pH 7, and dialysed at 4°C against distilled water for 12h and twice against Tris buffer for 8h. Additionally, plasma samples were concentrated with Centricon-5 (Amicon™).

2.5. Phenoloxidase assays

Phenoloxidase-like (PO-like) activity was measured spectrophotometrically by recording the formation of o-quinones. The method of Asokan et al [23] was used with some modifications. PO assays were conducted in 96-well microplates (Nunc, France). Dopamine or p-phenylenediamine (PPD) were used as substrates, at final concentrations of 100 mM and 50 mM, respectively. Dopamine (100 mM) was prepared just before being used in Tris buffer (0.1 M Tris HCl, 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂ and 10 mM CaCl₂) adjusted to pH 7. At 25°C, 10 µl of sample were incubated with 80 µl of dopamine and 50 µl of Tris buffer. Several control wells were systematically used: 'buffer control' containing only buffer, 'sample control' containing only sample and buffer, and 'non-enzymatic control' containing only substrate and buffer, always in a final volume reaction of 140µl. Immediately after dopamine addition, PO-like activity was monitored during 4h by using a VersaMax™ microplate reader (Molecular Devices) and by following the increase of absorbance at 490 nm. Because of solubility constraints, the protocol was slightly modified in the case of PPD: the sample was incubated with 7 µl of PPD (50 mM diluted in methanol) and 123 µl of buffer (no effect of methanol was observed on the enzymatic reactions). PO-like activity was monitored during 2h at 420 nm. For all conditions, the experiments were performed with three oyster pools. Each pool was tested in triplicate wells and average rates were calculated.

For enzymatic oxidation, the results were systematically corrected for non-enzymatic autooxidation of the substrate and were expressed in specific activity (SA), i.e. in international units (IU) per mg of protein. One IU is defined as the amount of enzyme that catalyzes the appearance of 1 µmole of product per min [24] under the above conditions using molar extinction coefficient of 3 300 M⁻¹ cm⁻¹ for dopamine [25] and of 43 160 M⁻¹ cm⁻¹ for PPD [26, 27].

2.6. Phenoloxidase inhibition assays

Working solutions of inhibitors were prepared just before being used in Tris buffer. PO inhibition assays were performed by preincubating 10 µl of the specific PO inhibitor PTU (5 mM, final concentration), or the specific laccase inhibitor CTAB (1 mM, final concentration), with 10 µl of sample for 20 minutes. Then, PO assay was carried out with dopamine (100 mM, prepared in Tris buffer) or PPD (50 mM, prepared in methanol). Appropriate controls were used as described before. Experiments were performed with three oyster pools. Each pool was tested in triplicate wells and average rates were calculated.

2.7. Protein assays

Protein concentrations were determined by the slightly modified Lowry method, as described previously [28].

2.8. Gel electrophoresis and zymography

To associate PO enzyme activities with individual proteins, and estimate the molecular weights of the enzymes, SDS-PAGE and zymography were used. Aliquots of the different oyster tissues (equivalent to 76 µg of proteins for gills, 76 µg for digestive gland, 57 µg for mantle, 40 µg for muscle, 47 µg for plasma and 1.55 µg for HLS) were mixed with sample buffer (65 mM Tris HCl pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 0.01% Bromophenol blue). Samples were then applied to 7% SDS-PAGE gels or 15% SDS-PAGE gels in non reducing conditions (with an upper gel of 4%) using a Mini-PROTEAN III Cell (Bio-Rad). Electrophoresis was carried out according to the method of Laemmli [29] at 110V for 2h45. Two gels containing the same samples were run and processed in parallel. After electrophoresis, SDS-PAGE gels were washed 2x10min in distilled water and 2x10min in Tris buffer. The first SDS-PAGE gel was stained with a solution containing 100 mM L-tyrosine and 5 mM MBTH (to detect tyrosinase activity), 100 mM dopamine and 5 mM MBTH (to detect catecholase activity), or 100 mM PPD (to detect laccase activity). All substrates were dissolved in Tris buffer. The gels were developed for 1 h, at 25°C and then rinsed with distilled water several times, dried at room temperature and photographed.

The second SDS-PAGE gels were immediately washed with distilled water and stained with Coomassie brilliant blue R-250 for visualizing total proteins. The molecular weight of PO activity bands were estimated with pre-stained molecular weight markers (Broad Range Markers, Tebu Bio, France) that were run together with samples (data not shown).

2.9. Proteomic analyses

2.9.1. In gel trypsin digestion

Coomassie blue-stained protein bands were excised from SDS-PAGE gel using sterile scalpel blades. Excised bands were destained twice for 15 min in solution containing 50 mM NH_4HCO_3 and 50% acetonitrile, dehydrated in 100% acetonitrile and dried 10 min at 37°C. Protein reduction was performed by soaking in 10 mM dithiothreitol, 45 min at 56°C. Then protein alkylation was realized in 55 mM iodoacetamide, 45 min, in darkness. After a 30 min cleaning in ultrapure quality water, gel pieces were dehydrated in 100% acetonitrile and dried 10 min at 37°C. Gel pieces were then rehydrated at 4°C for 20 min in a digestion buffer (10 ng.µl⁻¹ trypsin, 25 mM NH_4HCO_3). Ten µl of 25 mM NH_4HCO_3 were added and samples were incubated overnight at 37°C. After incubation, the supernatant containing tryptic peptides was transferred in another tube. Gel pieces were re-extracted by 50% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid. Supernatants were pooled and dried in a vacuum centrifuge. Tryptic peptides were resuspended in 0.1% trifluoroacetic acid and were desalted and concentrated using ZipTip_{c18} pipette tips according to manufacturer's instructions.

2.9.2. Protein identification by mass spectrometry

Peptides were spotted on MALDI target with 5 mg.ml⁻¹ CHCA in 50% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid, by using the dried droplet method. Mass spectra were acquired at the proteomic platform of Jacques Monod Institute (Paris, France) using MALDI TOF TOF ABI 4800+ (Applied Biosystems) equipped with YAG-200 Hz laser (355 nm). Spectra acquisition and processing was performed using the 4000 Series Explorer software (ABI) version 3.5.1. Generated peptide mass fingerprint and MS/MS peak lists were submitted to an in-house mascot (Matrix science) search engine using the following parameters: Database search: NCBIInr, precursor tolerance: 50 ppm, MS/MS tolerance: 0.3 Da, Met(O) and Cys-carboxyamidomethylation specified as variable modification, enzyme specificity was trypsin, 1 missed cleavage was possible.

2.10. Statistical analysis

All values are reported as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was carried out with SYSTAT 11.0. Values were tested for normality (Shapiro test) and homogeneity of variances (Bartlett test). For normal values, one-way ANOVA tests were used followed by a Dunnett post-hoc test. For non normal values, Kruskal-Wallis tests were applied, followed by Dunn's multiple comparisons test [30]. The statistical significance was designed as being at the level of $p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$.

3. Results

3.1. SDS-PAGE electrophoresis and zymographic studies

PO-like activity was detected in all oyster tissues that were analyzed by SDS-PAGE zymographs, with both dopamine (Fig. 1a) and PPD (Fig. 1b) as substrates. Moreover, bands from 60P-SAS were more intense than bands from crude samples indicating an efficient concentration of the proteins by partial purification with 60P-SAS. Nonetheless, PO profiles differed depending on the oyster tissue that was analyzed by zymography. With dopamine as substrate, the activity detected for the gills, the digestive gland and the mantle corresponded to one upper band with an estimated molecular weight of ~200 kDa and, for the gills, the mantle, the plasma and the crude HLS to one lower band with an estimated molecular weight of ~10 kDa (Fig. 1a). Similarly, an upper band with a molecular weight of ~200 kDa was observed in the presence of PPD for the gills and the mantle, but not for the digestive gland (Fig. 1b), and a lower band with a molecular weight of ~10 kDa was detected in the presence of PPD for the gills, the digestive gland, the mantle, the crude plasma and the crude HLS (Fig. 1b). Lower bands could not be detected with 60P-SAS samples for the HLS with dopamine and PPD as substrates. Interestingly, partial purification with 60P-SAS of the plasma sample, followed by concentration with Centricon-10, lead to the visualization of a protein band of ~10 kDa, but only with dopamine as substrate (Fig. 1a). The bands of ~10 kDa exhibiting PO-like activity were not likely to be an artefact since they stained differentially with dopamine and PPD, depending on the tissue that was analyzed. When gels were stained with L-tyrosine, no bands were observed, and this, for all the oyster tissues tested, i.e. the gills, the digestive gland, the mantle, the muscle, the plasma and the HLS (data not shown).

3.2. Spectrophometric studies

The second aim of this study was to refine biochemical characterisation of PO-like activities previously detected by zymography, with spectrophotometric investigations (microplate assays). Specific PO substrates (L-tyrosine, dopamine and PPD) and inhibitor (PTU) and the laccase inhibitor, CTAB, were used. When L-tyrosine was used as substrate, no PO-like activity was detected in any of the tissues that were tested, i.e. gills, digestive gland, mantle, muscle, plasma and HLS, suggesting the absence of tyrosinase-like activity in *C. gigas* (data not shown). However, when dopamine and PPD were used as substrates, PO-like activity was detected in all oyster tissues (Table 1).

In the presence of the specific PO inhibitor, PTU (5 mM), and with dopamine as PO substrate, PO-like activity was partially inhibited in all tissues except in the muscle for which the inhibition was total (Table 1). This inhibition was also observed with the laccase substrate, i.e. PPD (Table 1). In the presence of the specific laccase inhibitor, i.e. CTAB (1 mM), and with dopamine as substrate, PO-like activity was completely inhibited in the gills, the digestive gland, the mantle and the muscle. With PPD as substrate, PO-like activity was completely inhibited by CTAB in the gills, the digestive gland, the mantle and the muscle (Table 1).

In previous results, the HLS has been showed to have higher PO-like activity when compared to plasma with both dopamine and PPD as substrates [7]. The same result was obtained when results were expressed in total PO-like activity (Table 2). In the present study and with dopamine as substrate, the highest total PO-like activity was found in the digestive gland, followed by the gills, the mantle and the muscle. With PPD as substrate, the highest total PO-like activity was found in the digestive gland followed by the muscle, the mantle and the gills (Table 2).

3.3. Mass spectrometry

Protein bands which were associated to PO activities were submitted to mass spectrometry. Lower bands of mantle and hemocytes were found to incorporate tryptic peptides that were homologous to a protein from *C. gigas* designated as cavortin (Table 3). Higher bands from gills, digestive gland and mantle were found to incorporate tryptic peptides homologous to actin proteins of the mosquito *Anopheles gambiae* str. PEST, the Atlantic horseshoe crab *Limulus polyphemus* and the trematod *Orientobilharzia turkestanicum*. Lower bands of digestive gland and muscle were found to incorporate tryptic peptides homologous to histone protein H4 of the pig roundworm *Ascaris suum* and to the SB2B hypothetical protein of the bacteria *Shewanella amazonensis*, respectively.

4. Discussion

4.1. Molecular weight characterization of POs

POs are of widespread occurrence in bacteria, fungi, plants, invertebrates and vertebrates [1]. Despite the importance of the reactions and the functional roles associated to POs, the enzymes belonging to the PO family have not been thoroughly characterised in molluscs and especially in bivalve species. In the current study, zymographic analyses suggest the

presence of catecholase- and/or laccase-like activities in the gills, the digestive gland, the mantle, the plasma and the HLS of *C. gigas*. These activities were found to be associated to proteins of different molecular weights, depending on the considered tissue. An upper band with an estimated molecular weight of ~200 kDa was detected, for the gills, the digestive gland and the mantle with dopamine as substrate, and only for the gills and the mantle with PPD as substrate. With both substrates, a band of ~10 kDa was detected for the gills, the mantle, the plasma and the HLS. SDS-PAGE zymographs with the digestive gland and with PPD as substrate were characterised by the absence of detection of the upper band and the detection of a lower band of ~10 kDa. These results suggest the presence in the digestive gland (i) of a catecholase-like activity associated to the upper band and (ii) of a laccase-like activity associated to the lower band.

Overall, zymography results are in agreement with molecular weights reported in the literature (Table 4). The molecular weights of POs can vary depending on the activation state, animal tissue and animal species that are studied. Indeed, the molecular weights of POs from different molluscs have been often estimated by exclusion chromatography or SDS-PAGE electrophoresis and are in the range of 35 to 381 kDa. Moreover, these differences in molecular weights may be explained by the existence of polymeric forms of the enzyme. Indeed, in invertebrates, POs occur as monomers, dimers, tetramers or pentamers [31]. Generally, the molecular weight of monomeric forms is about 40 to 45 kDa, and generally each subunit possesses two copper atoms [32]. In the bloodfluke planorb *Biomphalaria glabrata*, a monomer of 35 kDa has been detected while in the pearl oyster *Pinctada fucata*, two discrete bands of 43 and 49 kDa were observed and in the blue mussel *Mytilus edulis*, different active principles with sizes from 60 to 260 kDa were detected (Table 4). Moreover, in agreement with our studies, a lower band of ~10 kDa was also detected in the red swamp crayfish *Procambarus clarkia* [33].

4.2. Type of POs

In the present study, differences between tissues were observed in terms of (i) number and molecular weight of the bands detected by zymography, (ii) substrate affinity, and (iii) effect of PO inhibitors. Catecholase- and/or laccase-like activities were detected in the gills, the digestive gland, the mantle, the plasma and the HLS and a laccase-like activity was detected in the digestive gland. Depending on the substrate used, different protein bands were observed in the different oyster body tissues. No tyrosinase-like activity was detected. This coincides with properties of the Asian swimming crab *Charybdis japonica* [22] and the eastern oyster *C. virginica* [4], and differs from tyrosinase-type POs from other invertebrates, such as the vinegar fly *Drosophila melanogaster* [33], the bloodfluke planorb *B. glabrata* [34] and the Manila clam *Ruditapes philippinarum* [21]. In all tissues, PO-like activity was partially inhibited in the presence of PTU (5 mM) and completely inhibited in the presence of CTAB (1 mM) with dopamine and PPD as substrates (Table 1). These results are in agreement with those obtained previously with HLS [7]. Previous results revealed also that no inhibition was exerted by CTAB with plasma and with dopamine as substrate. This strongly suggested the presence of a catecholase-like activity in the plasma [7]. Inhibition results may differ because of the quantity of enzyme that is present in each tissue, e.g. a small PO-like activity was

detected in the muscle when compared to the other tissues. It may be possible also that, in terms of molecules, there are fewer molecules of 'laccase' than of 'catecholase', which could explain the complete inhibition observed in the presence of CTAB but the partial inhibition observed in the presence of PTU. Finally, residual activity in the presence of PTU may be due to the presence of other enzymes that are able to use PO substrates and that are not inhibited by PTU, such as peroxidases [35].

4.3. Localisation and possible roles

In the pearl oyster *Pinctada fucata*, a gene coding for a tyrosinase (OT47) is expressed in the middle fold of the mantle edge and is likely to be involved in the formation of the periostracum [36]. In oysters, there is no isolated periostracum [37]. Instead, the prismatic layer insoluble matrix plays an identical role of protective shield [38] and recently, PO activity was detected in the prismatic shell layer of *P. fucata* [39]. Therefore, PO-like activity detected in the mantle in the present study could play a protective role and participate to the production of the shell.

Mass spectrometry investigations showed that low bands detected by zymography in mantle and HLS samples incorporated peptides that closely resemble regions of the protein cavortin from *C. gigas* (Table 3). Cavortin has been described as the major hemolymph protein of *C. gigas* [40]. The protein comprises 174 amino acid residues totaling 19.4 kDa and is rich in histidine and aspartic acid. It consists of a single Cu/Zn SOD (superoxide dismutase) derived domain showing homology to each of the three SOD-like domains of pernin (GenBank Acc. No. AF273766), the related 60 kDa protein from the green-lipped mussel *Perna canaliculus* [41]. However, despite some homology to Cu/Zn SOD sequences, results from Scotti et al (2007) suggest that no SOD function has been retained in this protein [40]. Since oysters are regularly challenged by microorganisms and potentially harmful chemicals in their environment, cavortin may function as a defence protein. Indeed, early reports described this protein as a natural hemagglutinin from the hemolymph of *C. virginica* [42, 43]. Subsequently it was designated as a carbonic anhydrase [44], until it was later described as a protein derived from a Cu/Zn SOD, i.e. the cavortin [41]. However, even if its function remains unclear, the apparent persistence of these shellfish proteins throughout millions of years of evolution, their presence at such high concentrations in the hemolymph and the high conservation of amino acid sequences argue that they must fulfill some crucial biological function. There is an indication that cavortin may have a role in survival and/or defence in Pacific oysters. Interestingly, a previous study of *C. gigas* by Huvet et al (2004) showed that cavortin is more highly expressed in oysters that are resistant to summer mortality compared to susceptible oysters, suggesting that cavortin is likely to be associated with resistance to summer mortality [45]. Tanguy et al (2004) also noted differential expression of the cavortin gene from *C. virginica* in response to infection of the oysters with the protozoan *Perkinsus marinus*, which is consistent with a role in defence [46]. One intriguing possibility from our results is that, in *C. gigas*, SOD-like proteins have developed PO-like activities or otherwise contribute to oxidative processes associated with parasite killing. Our results are in agreement with those obtained in the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* [47]. The authors found a strong association between QX disease resistance and the PO

system, with PO activities being higher in QX-resistant oysters compared to susceptible populations [48]. Moreover, two proteins associated with resistance were found to be homologous to SOD-like molecules from *C. gigas* and *C. virginica* [47]. The authors suggested also that the cavortin from *S. glomerata* may possess PO-like activities. Therefore, more studies should be carried out in order to clarify the cavortin enzyme activities and functions.

It is important to notice that the other protein bands from the different oyster body tissues (gills, digestive gland and muscle) exhibiting PO-like activities did not show similarities with the cavortin. Cavortin is a protein that is likely to be present in important quantities in *C. gigas*. Therefore, if other proteins are present in *C. gigas* in a less important quantity than cavortin, their presence will be masked by the presence of cavortin if they migrate to the same point in SDS-PAGE electrophoresis gels. The lack of similarities with other *C. gigas* proteins may be due also to the fact that an important amount of proteins have not been sequenced yet, and therefore are not present in the sequence databases we used. We are currently further studying the possible presence of other proteins.

Overall, the data presented here suggest that numerous differences exist between the tissues and the hemolymphatic compartment in *C. gigas*, both in terms of PO-like activities and in terms of proteins that may be responsible for these activities, and that zymography associated to mass spectrometry analysis is a useful way of characterizing PO-like activities present in this organism. These results provide also insights of possible functions of cavortins in this marine organism.

Acknowledgements

This study was supported by a PhD grant from the Conseil Général of the Charente-Maritime for A. Luna-Acosta. The Conseil Régional de Poitou-Charentes is acknowledged for financial support through the research project 'POLERON' (Modifications chimiques de polluants organiques dans le bassin de Marennes-Oléron, toxicité des produits de dégradation sur l'huître creuse). We thank Julie LeFaouder (Institut Claude Bernard and its proteomic platform) for her contribution in the achievement of peptide mass fingerprint analyses.

References

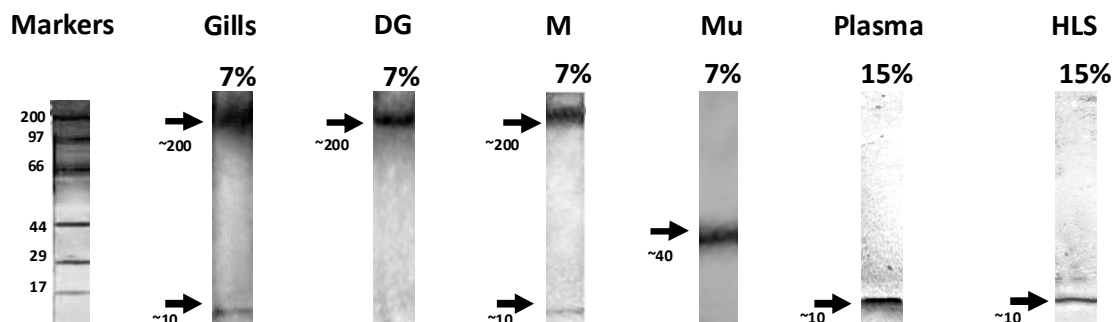
- [1] L. Cerenius, B. Lee, K. Söderhäll, The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity, *Trends Immunol.* 29 (2008) 263-271.
- [2] E. Solomon, U. Sunduran, T. Machonkin, Multicopper oxidases and oxygenases, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2563-2606.
- [3] C. Thurston, The structure and function of fungal laccases, *Soc. Gen. Microbiol.* 140 (1994) 19.
- [4] P. Jordan, L. Deaton, Characterization of phenoloxidase from *Crassostrea virginica* hemocytes and the effect of *Perkinsus marinus* on phenoloxidase activity in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Geukensia demissa*, *J. Shellfish Res.* 24 (2005) 477-482.
- [5] P. Williamson, Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*, *Front. Biosc.* 2 (1997) 99-107.

- [6] J. Walker, R. McCallion, The selective inhibition of *ortho*- and *para*-diphenol oxidases, *Phytochemistry* 19 (1980) 373-377.
- [7] A. Luna-Acosta, E. Rosenfeld, M. Amari, I. Fruitier-Arnaudin, P. Bustamante, H. Thomas-Guyon, First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Fish Shell. Immunol.* 28 (2010) 719-726.
- [8] D. Cheney, E. Macdonald, R. Elston, Summer mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, *J. Shellfish Res.* 19 (2000) 353-359.
- [9] A. Bado-Nilles, B. Gagnaire, H. Thomas-Guyon, S. Le Floch, T. Renault, Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), *Toxicol. in Vitro* 22 (2008) 1610-1617.
- [10] B. Gagnaire, H. Thomas-Guyon, T. Renault, In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes, *Fish Shell. Immunol.* 16 (2004) 501-512.
- [11] A. Luna-Acosta, P. Bustamante, J. Godefroy, I. Fruitier-Arnaudin, H. Thomas-Guyon, Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed *in situ* *Env. Sci. Pol. Res.* 17 (2010) 999-1008.
- [12] A. Bado-Nilles, S. Le Floch, T. Renault, N. Faury, M. Auffret, C. Quentel, H. Thomas-Guyon, Effects of two oils on immune parameters and on the expression of immune related genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Physiomar*, 2008.
- [13] K. Nagai, M. Yano, K. Morimoto, H. Miyamoto, Tyrosinase localization in mollusc shells, *Comp. Biochem. Physiol. B* 146 (2007) 207-214.
- [14] C. Hellio, N. Bourgougnon, Y. Le Gal, Phenoloxidase (E.C. 1.14.18.1) from *Mytilus edulis* byssus gland : purification, partial characterization and application for screening products with potential antifouling activities, *Biofouling* 16 (2000) 235-244.
- [15] H. Decker, M. Ryan, E. Jaenicke, N. Terwilliger, SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 17796-17799.
- [16] W. Cardenas, J. Dankert, Cresolase, catecholase and laccase activities in haemocytes of the red swamp crayfish, *Fish Shell. Immunol.* 10 (2000) 33-46.
- [17] R. Perdomo-Morales, V. Montero-Alejo, E. Perera, Z. Pardo-Ruiz, A. Alonso-Jiménez, Phenoloxidase activity in the hemolymph of the spiny lobster *Panulirus argus*, *Fish Shell. Immunol.* 23 (2007) 1187-1195.
- [18] M. Dicko, R. Hilhorst, H. Gruppen, C. Laane, W. van Berkel, A. Voragen, Zymography of monophenolase and o-diphenolase activities of polyphenol oxidase, *Anal. Biochem.* 306 (2002) 336-339.
- [19] B. Gagnaire, T. Renault, H. Thomas-Guyon, In vitro and in vivo effects of mercury on haemocytes of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg): development of techniques evaluating estuarine pollution, V Congrès International de Limnologie-Océanographie, Archimer, Paris, 2004.
- [20] C. Hellio, A. Bado-Nilles, B. Gagnaire, T. Renault, H. Thomas-Guyon, Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*, *Fish Shell. Immunol.* 22 (2007) 433-440.
- [21] R. Cong, W. Suna, G. Liub, T. Fana, X. Menga, L. Yanga, L. Zhub, Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*, *Fish Shell. Immunol.* 18 (2005) 61-70.
- [22] G. Liu, L. Yang, T. Fan, R. Cong, Z. Tang, W. Sun, X. Meng, L. Zhu, Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica*, *Fish Shell. Immunol.* 20 (2006) 47-57.
- [23] R. Asokan, M. Arumugam, P. Mullainadhan, Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus, *Dev. Comp. Immunol.* 21 (1997) 1-12.
- [24] L. Fenoll, J. Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Molina, F. Garcia-Canovas, J. Tudela, Unification for the expression of the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase, *Int. U. Biochem. Mol. Biol. Life* 54 (2002) 137-141.

- [25] J. Waite, Calculating extinction coefficients for enzymatically produced o-quinones, *Anal. Biochem.* 75 (1976) 211-218.
- [26] C. Eggert, U. Temp, K. Eriksson, The lignolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase, *App. Env. Microbiol.* 62 (1996) 1151-1158.
- [27] P. Paranjpe, M. Karve, S. Padhye, Characterization of tyrosinase and accompanying laccase from *Amorphophallus campanulatus*, *Indian J. Biochem. Biophys.* 40 (2003) 40-45.
- [28] P. Smith, R. Khron, G. Hermanson, A. Mallia, F. Gartner, M. Provanzano, E. Fujimoto, N. Goeke, B. Olson, N. Goeke, B. Olson, D. Klenk, Measurement of a protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76-85.
- [29] U. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [30] J. Zar, *Biostatistical analysis*, Prentice-Hall, New Jersey, 1984, 718 p.
- [31] E. Jaenicke, H. Decker, Tyrosinases from crustaceans form hexamers, *Biochem. J.* 371 (2003) 515-523.
- [32] G. Prota, J. Ortonne, C. Voulot, C. Khatchadourian, G. Nardi, A. Palumbo, Occurrence and properties of tyrosinase in ejected ink of cephalopods, *Comp. Biochem. Physiol. B* 118 (1981) 463-469.
- [33] N. Asada, T. Fukumitsu, K. Fujimoto, K. Masuda, Activation of prophenoloxidase with 2-propanol and other organic compounds in *Drosophila melanogaster*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23 (1993) 515-520.
- [34] G. Bai, J. Brown, C. Watson, T. Yoshine, Isolation and characterization of phenoloxidase from egg masses of the gastropod mollusc, *Biomphalaria glabrata*, *Comp. Biochem. Physiol. B* 118 (1997) 463-469.
- [35] G. Happ, Quinone and hydrocarbon production in the defensive glands of *Eleodes longicollis* and *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae), *J. Insect Physiol.* 14 (1968) 1821-1837.
- [36] C. Zhang, L. Xie, J. Huang, K. Chen, R. Zhang, A novel putative tyrosinase involved in periostracum formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 342 (2006) 632-639.
- [37] A. Wheeler, K. Rusenko, D. Swift, C. Sikes, Regulation of *in vitro* and *in vivo* CaCO₃ crystallization by fractions of oyster shell organic matrix, *Mar. Biol.* 98 (1988) 71-80.
- [38] M. Almeida, J. Machado, M. Vieira Coelho, P. Soares da Silva, J. Coimbra, L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) secreted by oyster (*Crassostrea gigas*) mantle cells: functional aspects, *Comparative Biochemistry and Physiology, B* 120 (1998) 709-713.
- [39] K. Nagai, M. Yano, K. Morimoto, H. Miyamoto, Tyrosinase localization in mollusc shells, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 146 (2007) 207-214.
- [40] P. Scotti, S. Dearing, D. Greenwood, Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), *New Zealand J. Mar. Fresh. Res.* 41 (2007) 91-101.
- [41] P. Scotti, S. Dearing, D. Greenwood, R. Newcomb, Pernin: a novel self-aggregating haemolymph protein from the New Zealand greenlipped mussel, *Perna canaliculus* *Comp. Biochem. Physiol. B* 128 (2001) 767-779.
- [42] M. Tripp, Hemagglutinin in the blood of the oyster *Crassostrea virginica*, *J. Invert. Path.* 8 (1966) 478-484.
- [43] R. Acton, J. Bennett, E. Evans, R. Schrohenloher, Physical and chemical characterization of an oyster hemagglutinin, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 4128-4135.
- [44] S. Nielsen, E. Frieden, Carbonic anhydrase activity in molluscs, *Comp. Biochem. Physiol. B* 41 (1972) 461-468.
- [45] A. Huvet, A. Herpin, L. Dégremont, Y. Labreuche, J. Samain, C. Cunningham, The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality, *Gene* 343 (2004) 211-220.
- [46] A. Tanguy, X. Guo, S. Ford, Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern *Crassostrea virginica* and Pacific *C. gigas* oysters, *Gene* 338 (2004) 121-131.

- [47] M. Simonian, S. Nair, J. Nell, D. Raftos, Proteomic clues to the identification of QX disease resistance biomarkers in selectively bred Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*, *J. Proteomics* 73 (2009) 209-217.
- [48] R. Peters, D. Raftos, The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*), *Aquaculture* 223 (2003) 29-39.
- [49] T. Fan, M. Li, J. Wang, L. Yang, R. Cong, Purification and characterization of phenoloxidase from *Octopus ocellatus*, *Acta Biochim. Biophys. Sinica* 41 (2009) 865-872.
- [50] T. Naraoka, H. Uchisawa, H. Mori, H. Matsue, S. Chiba, A. Kimura, Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mollusk, *Illex argentinus*, *Europ. J. Biochem.* 270 (2003) 4026-4038.
- [51] L. Renwranz, W. Schmalmack, R. Redel, B. Friebe, H. Schneeweib, Conversion of phenoloxidase and peroxidase indicators in individual haemocytes of *Mytilus edulis* specimens and isolation of phenoloxidase from haemocyte extract, *J. Comp. Physiol. B* 165 (1996) 647-658.
- [52] N. Maruyama, H. Etoh, K. Sakata, K. Ina, Studies on phenoloxidase from *Mytilus edulis* associated with adhesion, *Agric. Biol. Chem.* 55 (1991) 2887-2889.
- [53] J. Waite, K. Wilbur, Phenoloxidase in the periostracum of the marine bivalve *Modiolus demissus* Dillwyn, *J. Exp. Zool.* 195 (1976) 359-367.

a. Stained with 100 mM dopamine/5 mM MBTH



b. Stained with 50 mM PPD

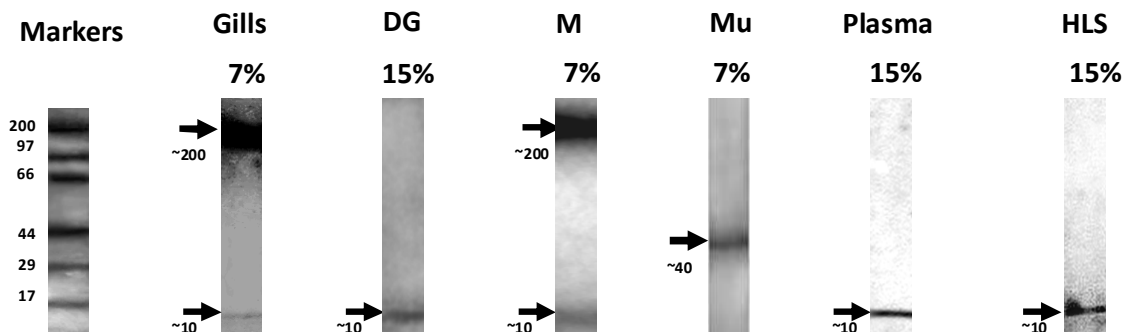


Figure 1 Zymograms for the determination of phenoloxidase activities from different *C. gigas* tissues before (0) and after (60) partial purification by precipitation with 60% of sulfate ammonium saturation. Samples were run on 7% analytical SDS-PAGE gels and stained with (a) 100 mM dopamine and 5 mM MBTH and with (b) 100 mM PPD. Gills, digestive gland (DG), mantle (M), muscle (Mu), plasma and HLS were loaded at a protein concentration of 76, 76, 57, 40, 57 and 1.55 μg , respectively. The arrows indicate the bands showing PO-like activity. Their estimated molecular weights (in kDa) are indicated below the arrows.

Table 1 Phenoloxidase-like specific activity (Mean \pm standard deviation, $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$; n=3) from different oyster body tissues with dopamine and PPD as substrates and with PTU, 4-HR and CTAB as PO, catecholase and laccase inhibitors, respectively. One international unit of specific activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the appearance of 1 μmole of product per min per mg of protein. *, **, * = statistical difference for $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.**

Body tissue		PO-like specific activity							
		Dopamine				PPD			
		Control	+ PTU ¹	+ 4-HR ²	+ CTAB ³	Control	+ PTU ¹	+ 4-HR ²	+ CTAB ³
Tissues	Gills	43.9 \pm 8.5	19.7 \pm 3.1**	69.5 \pm 27.4	< 0***	4.7 \pm 0.9	2.5 \pm 0.8*	4.3 \pm 0.6	< 0***
	Digestive gland	33.3 \pm 4.4	19.75 \pm 4.3*	50.4 \pm 22.9	< 0***	3.6 \pm 0.7	< 0***	6.9 \pm 1.0	< 0***
	Mantle	45.4 \pm 2.8	23.3 \pm 5.6*	42.5 \pm 6.3	< 0***	8.7 \pm 0.7	< 0***	< 0***	< 0***
	Muscle	6.4 \pm 3.0	< 0**	< 0***	< 0***	3.4 \pm 0.2	< 0**	< 0***	< 0***
Hemolymphatic compartment	Plasma ³	31.0 \pm 5.2	13.2 \pm 1.9**	23.0 \pm 3.8	30.6 \pm 2.4	1.5 \pm 0.5	< 0***	1.8 \pm 0.9	< 0***
	HLS ³	133.1 \pm 25.8	57.1 \pm 16.7**	109.6 \pm 17.9	< 0**	50.4 \pm 4.3	5.1 \pm 1.1***	45.4 \pm 21.1	< 0***

Table 2 Total phenoloxidase-like activity (Mean \pm standard deviation, $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}\cdot\text{g fresh wt}^{-1}$, n=3) from different oyster body tissues with dopamine and PPD as substrates.

Body tissue		Total phenoloxidase-like activity	
		Dopamine	PPD
Tissues	Gills	1.8 \pm 0.3	0.2 \pm 0.0
	Digestive gland	3.0 \pm 0.4	50.4 \pm 4.3
	Mantle	0.9 \pm 0.1	0.2 \pm 0.0
	Muscle	0.5 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1

Table 3 Mascot search results for MS/MS analysis of *C. gigas* proteins extracted from low bands of mantle and HLS samples, detected by zymography (significant score cutoff: > 50%).

Body tissue	Best match	Mascot score	Protein score C.I. %	Coverage (%)	m/z (observed)	m/z (calculated)	Start sequence	End sequence	Ion score	Matching peptide sequences
HLS	Cavortin protein from the	99	99.959	5	1193.5774	1193.5844	65	74	61	VHGSIMHQR
	Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i>	99	99.959	8	1801.9178	1801.9232	150	165	28	TFDWLTIGHTDGILGR
Mantle	(Accession n°: <u>Q5QGY9_CRAGI</u> ; 192 aa)	78	95.425	5	1193.5699	1193.5844	65	74	68	VHGSIMHQR
		78	95.425	8	1801.9044	1801.9232	150	165	N.D.	TFDWLTIGHTDGILGR

N.D. Not determined

Annexe 4 : First evidence of a potential antibacterial activity involving the phenoloxidase system in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* hemocytes

First evidence of a potential antibacterial activity involving the phenoloxidase system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes

Andrea Luna-Acosta^{a,*}, Denis Saulnier^{b,c}, Mylène Pommier^a, Philippe Haffner^b, Sophie De Decker^b, Tristan Renault^b, Hélène Thomas-Guyon^{a,*}

^a Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges - F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

^b Laboratoire de Génétique et Pathologie, Ifremer, av. du Mus de Loup, 17390 La Tremblade,
France

^c Present address : Laboratoire Biotechnologie et Qualité de la Perle, Centre Océanologique du Pacifique, Ifremer, BP 7004, 98719 Taravao, French Polynesia

* **Corresponding authors:** H. Thomas-Guyon and A. Luna-Acosta
Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs)
UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle
2 rue Olympe de Gouges
F-17042 La Rochelle Cedex 01, France
Email : hthomas@univ-lr.fr / aluna1508@yahoo.com
Tel : +33 (0)5 46 50 76 23
Fax : +33 (0)5 46 50 76 63

Abstract

Phenoloxidasés (POs) are a family of copper proteins including tyrosinases, catecholases and laccases. Although these enzymes are widely recognized as an integral part of bivalve immune defence system, experimental evidence is lacking that PO cascade participates in the direct killing of invading microorganisms in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. After being treated with *C. gigas* haemocyte lysate supernatant (HLS) and a common substrate of POs, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), to detect PO-type catecholase activity, or a specific substrate of laccases, p-phenylenediamine (PPD), to detect PO-type laccase activity, *V. splendidus* LGP32 and *V. aestuarianus* 02/041 growth were affected. These effects were suppressed when the specific PO inhibitor, phenylthiourea (PTU), was added to the medium. Similar results were confirmed with partially purified fractions of HLS proteins, particularly in the presence of PPD for *V. splendidus* LGP32. These results suggest that antibacterial activities of HLS from *C. gigas* potentially involve PO, and more particularly laccase catalysed reactions.

Keywords: catecholase - laccase - antibacterial activity - *Vibrio* - bivalve - immunity

Abbreviations: POs, phenoloxidasés; HLS, haemocyte lysate supernatant; L-DOPA, L-3,4-dihydroxyphenylalanine; PPD, p-phenylenediamine; PTU, 1-phenyl-2-thiourea; DETC, diethyldithiocarbamate; CTAB, cethyltrimethylammonium bromide; OD, optical density.

Introduction

POs (EC 1.14.18.1) are a family of copper proteins including tyrosinases (EC 1.14.18.1), catecholases (EC 1.10.3.1) and laccases (EC 1.10.3.2). The three types of POs are capable of o-diphenol oxidation (catecholase activity). However, among these three enzymes, only tyrosinases can hydroxylate monophenols, e.g. L-tyrosine (monophenoloxidase activity), and only laccases can oxidise p-diphenols and aromatic compounds containing amine groups, e.g. p-phenylenediamine or PPD (laccase activity; Thurston 1994, Solomon *et al.* 1996). POs are the rate limiting enzymes in melanisation (Sanchez-Ferrer *et al.* 1995, Chase *et al.* 2000), and play an important role in immune defence mechanisms in invertebrates (Cerenius *et al.* 2008). In these organisms, POs exist as an inactive form, proPO. Pathogen associated molecular patterns (PAMPs), such as peptidoglycans or lipopolysaccharides from bacteria and β -1,3-glucans from fungi are recognized by pattern-recognition receptors (PRRs). This will trigger the activation of a cascade of serine proteases that will activate PO-activating enzymes (PPAs), and therefore, the activation of the pro-enzyme proPO into PO (Cerenius *et al.* 2008).

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1753) is an ecologically and economically important species that dominates over all other molluscs with respect to global world distribution and aquaculture production (FAO 2005). However, massive summer mortalities of *C. gigas* have become a widespread concern in the world in recent decades (Cheney *et al.* 2000, Huvet *et al.* 2004, Garnier *et al.* 2007). Studies have shown a positive correlation between *C. gigas* summer mortalities and the presence of pathogens (e.g. bacteria or viruses) (Nicolas *et al.* 2007). Moreover, defence mechanisms in invertebrates, particularly in bivalves, have shown to be affected by environmental factors (Garnier *et al.* 2007). Recently, POs have been detected and identified in the haemolymph of *C. gigas* (Luna-Gonzalez *et al.* 2003, Hellio *et al.* 2007, Luna-Acosta *et al.* 2010a). Moreover, studies carried out in this organism have shown that the activity of POs can be modulated by environmental factors, such as the presence of heavy metals or hydrocarbons (Gagnaire *et al.* 2004, Bado-Nilles *et al.* 2008, Luna-Acosta *et al.* 2010b). In addition, the expression of a gene coding for a putative laccase in *C. gigas* was shown to be modulated in the presence of hydrocarbons (Bado-Nilles *et al.* 2008). However, although POs seem to play an important role in immune defence mechanisms in bivalves (Peters & Raftos 2003, Jordan & Deaton 2005), experimental evidence is lacking that POs participate in immune defences against microorganisms infecting this particular host.

Therefore, the aims of this study were (i) to study the implication of PO activity(ies) on *C. gigas* immune defence system through antimicrobial assays and (ii) to identify which type(s) of PO activity(ies) are implicated in this mechanism. For this purpose, different *C. gigas* tissues, i.e. the digestive gland, the gills, the mantle, the plasma (acellular fraction of the haemolymph) and the HLS, were analysed for their ability to inhibit *in vitro* the growth of oyster bacterial pathogens related to *Vibrio splendidus* and *V. aestuarianus*. These bacterial pathogens were found to be associated to *C. gigas* summer mortality outbreaks in France (Saulnier *et al.* 2009a). A common substrate of POs, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), used to detect catecholase activity, a specific substrate of laccase, PPD, used to detect laccase activity, and a specific inhibitor of POs,

PTU, used to inhibit all types of POs, were tested for identification of POs activities, particularly in HLS. Furthermore, protein fractions obtained by partial purification of HLS were tested to confirm the implication of proteins in antibacterial activities.

Materials and methods

Oysters

Three-year-old Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (mean \pm SD; weight: 75.5 ± 8.7 g; length: 9 ± 3 cm) were purchased during October-November 2008 from shellfish farms in Aytré (Charente Maritime, France), on the French Atlantic coast, and were processed immediately after their arrival in the laboratory.

Preparation of oyster tissue extracts

After opening the oyster shells by cutting off the adductor muscle, haemolymph (0.5-1 ml) was withdrawn directly from the pericardial cavity, with a 1-ml syringe equipped with a needle (0.9 x 25 mm), and haemolymphs from 10 oysters were pooled Gagnaire *et al.* 2004d. Haemolymph samples were centrifuged (260 g, 10 min, 4°C) to separate the cellular fraction (i.e., haemocytes) from the acellular fraction Hellio *et al.* 2007d. Aliquots (100 μ l) were stored at -80°C. Each aliquot was used only once. The digestive gland, the gills and the mantle from 10 oysters were dissected and pooled. Haemocytes, digestive gland, gills and mantle were homogenized at 4°C in Tris buffer (0.1 M Tris HCl, 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂ and 10 mM CaCl₂) adjusted to pH 7 (1 ml of buffer for HLS, 1 ml.g⁻¹ of fresh weight for the digestive gland and the mantle and 0.5 ml.g⁻¹ of fresh weight for the gills). Digestive gland, gills and mantle were lysed using an Ultra-Turrax (T25 basic, IKA-WERKE) at 19 000 rpm for 30 sec and a Thomas-Potter homogenizer (IKA-Labortechnik, clearance 0.13-0.18mm) at 200 rpm for 1 min, and centrifuged at 10 000g for 10 min at 4°C. The resulting supernatants were collected. Haemocytes were lysed using Thomas-Potter homogenizer at 200 rpm for 1 min and centrifuged at 10 000g for 10 min at 4°C. The resulting HLS was collected. The resulting digestive gland, gills, mantle, acellular fraction of the haemolymph and HLS samples were filtered at 0.22 μ m (Millipore membrane-Millipore Co., Bedford, MA, USA) to eliminate bacteria. Absence of bacterial development in filtered samples was tested by incubating the samples with Zobell medium and by measuring potential bacterial growth with a spectrophotometer at 620 nm wavelength during at least 7h (data not shown). Aliquots (100 μ l) were stored at -80°C. Each aliquot was used only once.

Preparation of protein fractions from haemocyte lysate supernatant

HLS was precipitated overnight with 60 % saturated (NH₄)₂SO₄ solution at 4°C. After centrifugation at 10 000 g for 10 min at 4°C, the precipitate was dissolved in 1 ml Tris buffer (0.1 M Tris HCl, 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂ and 10 mM CaCl₂) and dialyzed against the same buffer. Aliquots (100 μ l) of the dialyzates were stored at -80°C before being tested for PO-like activity.

Chemicals

PO substrates (dopamine, L-DOPA) and inhibitors (PTU, DETC), laccase substrate (PPD) and inhibitor (CTAB), mushroom tyrosinase and *Trametes versicolor* laccase were purchased from Sigma (France).

Bacterial strains

Virulent *V. splendidus* LGP32 strain (Gay *et al.* 2004, Garnier *et al.* 2007) and *V. aestuarianus* 02/041 strain (Garnier *et al.* 2007) isolated in experimental cohabitation trials (Ifremer, La Tremblade, France) and from the Ifremer experimental hatchery at Argenton (Brittany, France), respectively, were used in antibacterial assays. Bacteria were grown at 20 °C for 20 h in Marine Broth (Difco) under constant shaking until to reach the stationary phase. The bacterial culture concentrations were evaluated spectrophotometrically at an OD of 600 nm. Cells were centrifuged at 3 200 g for 10 min, the supernatant discarded and the resulting pellet resuspended in sterile artificial seawater to obtain an OD of 1 that corresponded to a concentration of $1-2 \cdot 10^9$ colony forming units per ml for both bacterial strains.

Phenoloxidase assays

Catecholase-type PO activity was measured spectrophotometrically by recording the formation of o-quinones, by using the method described previously (Luna-Acosta *et al.* 2010a). For all conditions, assays were performed with three 10-oyster pools. Each pool was tested in triplicate wells. Results were systematically corrected for non-enzymatic autoxidation of the substrate. Specific activities (SA) were expressed in international units (IU) per mg of total protein. One IU is defined as the amount of enzyme that catalyzes the appearance of 1 μ mole of product per min (Fenoll *et al.* 2002).

PO inhibition assay was performed by preincubating 10 μ l of PO inhibitor (prepared at various concentrations in Tris buffer) with 10 μ l of sample for 20 minutes, at 25°C. Then, PO assay was carried out with dopamine or PPD. Assays were performed with three 10-oyster pools. Each pool was tested in triplicate wells. Enzymatic oxidation (in the presence of PO inhibitor) was systematically corrected for non-enzymatic autoxidation of the substrate (in the presence of PO inhibitor).

Protein determination

The protein concentration of oyster tissue extracts was determined by the slightly modified Lowry method, as described previously Smith *et al.* 1985a. Serum albumin (Sigma-Aldrich, France) was used as standard.

Effect of L-DOPA and PPD-derived compounds on bacterial growth

Concentrations given in the following protocol correspond to final concentrations in the medium reaction, before adding Marine Broth. Resuspended bacteria cells (5 μ l at OD of 1) were separately added to 100 μ l of prepared oyster tissue extracts and 100 μ l of L-DOPA (1.25 mM) or PPD solution (1.50 mM). The same protocol was used with PTU (1 mM)-treated HLS (100 μ l). Two type of controls were performed either replacing substrates by 100 μ l of Tris buffer as sterility controls of samples or replacing samples by

100µl of Tris buffer to monitor the potential inhibitory effect of substrates on bacterial growth. After a 90 min incubation at 25°C, the samples were again incubated with 4.0 ml of Marine Broth (Difco) and grown at 25°C with constant shaking. Then, A_{620} readings were carried out at 1-2h intervals for 3-7 h. The different samples were maintained at 25 °C in a rotor (10 tours per minute) during all the experiment.

Effects of purified mushroom tyrosinase and Trametes versicolor laccase on bacterial growth

The same protocol used to study the effect of L-DOPA and PPD-derived compounds on bacterial growth was conducted in the presence of 100 µl of mushroom tyrosinase (1 mg.ml⁻¹, Sigma) or *Trametes versicolor* laccase (1 mg.ml⁻¹, Sigma).

Statistical analysis

All values are reported as mean ± SEM. Statistical analysis was carried out with STATISTICA 7.0. Values were tested for normality (Shapiro test) and homogeneity of variances (Bartlett test). For normal values, a nested ANOVA test was used to analyse the results, with condition as fixed factor, and pool as random factor. Pool was nested within each combination of condition (Zar, 1984). When no significant differences were observed between pools and the null hypothesis (H_0 : no difference between conditions) was rejected, significant differences were tested using Tukey's HSD test. For non normal values, a Kruskal-Wallis test was carried out, followed by Dunn's multiple comparisons test (Zar 1984). Statistical significance was designed as being at the level of $p < 0.05$.

Results

Effect of PO-generated reactive intermediates on the growth of V. splendidus LGP32 strain in the presence of L-DOPA and oyster tissue extracts

When the different oyster tissue extracts (digestive gland, gills, mantle, plasma and HLS) were incubated in absence of L-DOPA with LGP32 strains, no inhibition of bacterial growth was observed (data not shown). When samples were preincubated with L-DOPA, LGP32 growth was reduced but only in the presence of HLS (Fig. 1). This effect was statistically significant after 5 and 6h of incubation in presence of Marine Broth. As a control, L-DOPA substrate was verified to display no toxic effect on LGP32 growth when used alone at 1.25 mM concentration (data not shown). Since inhibitory effects were noticed only with HLS and PO substrate, further studies were conducted with this oyster extract.

Effect of PO-generated reactive intermediates on the growth of V. splendidus and V. aestuarianus in the presence of L-DOPA or PPD and HLS

In order to confirm results obtained with LGP32, we decided (i) to test the effect of L-DOPA and HLS on an oyster bacterial pathogen phylogenetically distinct from *V. splendidus*, i.e. *V. aestuarianus* 02/041, and (ii) to test a PO substrate different from L-DOPA, i.e. PPD. Since PPD exerted an effect on bacterial growth in the absence of HLS (data not shown), results were expressed as the percentage of inhibition due to HLS

(Table 1). In the presence of L-DOPA or PPD, a growth stimulation of 4 to 37 % was observed during the first hours of incubation (Table 1). However, in the presence of L-DOPA, a LGP 32 growth inhibition of 21 ± 8 , 43 ± 15 , 48 ± 15 , 45 ± 14 , 28 ± 14 %, was observed after 3, 4, 5, 6 and 7h of incubation, respectively and a 02/041 growth inhibition of 20 ± 18 , 31 ± 22 and 31 ± 24 % was observed after 5, 6 and 7h of incubation, respectively (Table 1). Interestingly, when PPD was used as substrate a later but similar inhibition of LGP32 and 02/041 growths were observed: 18 ± 1 and 29 ± 1 % of inhibition for LGP 32 at 6 and 7h and 30 ± 6 % of inhibition for 02/041 at 7h (Table 1).

Effect of PO inhibitors on PO-generated reactive intermediates

In the absence of HLS, CTAB (0.5, 1 and 2 mM) and DETC (1, 3, 5 and 10 mM) but not PTU (1, 5 and 10 mM), exerted an inhibition on LGP32 bacterial growth (data not shown). Therefore, PO inhibitor effects were conducted only with the specific PO inhibitor, PTU. In the presence of PTU, the inhibition of LGP32 growth, produced in the presence of HLS and L-DOPA or PPD as substrates, was completely abolished, independently of the incubation time considered (Fig. 2a and b).

Effect of purified tyrosinase and laccase

In order to confirm that the bacterial growth inhibition observed was due to a laccase-type PO, a control was realized with purified mushroom tyrosinase and laccase from *Trametes versicolor*. Inhibition of bacteria growth by tyrosinase could not be monitored because darkening of the experimental wells interfered with turbidity measurements (data not shown). Inhibition by purified laccase from 33 ± 3 to 37 ± 10 % could be measured after 5, 6 and 7 incubation times and showed to be similar to growth inhibition observed with HLS and PO substrates (Table 1).

Effect of protein fractions from partially purified HLS and PTU on PO-generated reactive intermediates

Results obtained with LGP32, incubated with protein fractions from partially purified HLS from three different oyster pools, and with L-DOPA or PPD as substrates, were similar to those obtained with crude HLS, i.e. an inhibition of bacteria growth was observed (Fig. 3a). However, in the presence of PTU and with L-DOPA as substrate, no significant differences were observed between the conditions 'bacteria + substrate + sample' and 'bacteria + substrate + sample + PTU'. In contrast to this result, significant differences at incubation times of 5, 6 and 7 h were observed between these two conditions when PPD was used as substrate (Fig. 3b).

PO activity in crude and partially purified fractions of HLS

Enzymatic tests were performed to quantify PO activity in crude and partially purified fractions of HLS from *C. gigas*. Catecholase-type and laccase-type PO activities were detected in all samples with L-DOPA, dopamine and PPD as substrates (Table 2). A decrease of 57 to 69 % of activity was observed in partially purified fraction of HLS in comparison to crude fractions of HLS.

Discussion

The aim of the current work was (i) to study the implication of PO activity (ies) from *C. gigas* on immune oyster defence capacities through antimicrobial assays and (ii) to identify which type(s) of PO activity(ies) may be implicated on antibacterial activities. In other invertebrates, and specially in crustaceans, antibacterial activities have been detected in haemocytes, plasma or hepatopancreas (Chisholm & Smith 1995). In *C. gigas*, PO activities have been detected in the haemolymph (Luna-Gonzalez *et al.* 2003, Hellio *et al.* 2007, Luna-Acosta *et al.* 2010a). Therefore, the first aim of the current work was to study the antibacterial effects of different tissues from *C. gigas*, i.e. the digestive gland, the gills, the mantle, the plasma and the HLS of the haemolymph, on *V. splendidus* LGP32 growth. No oyster tissue exerted an antibacterial effect in the absence of added PO substrates. In the presence of L-DOPA, only HLS inhibited bacterial growth after having verified by enzymatic assays that samples exhibited PO activity. This result is in agreement with the fact that haemocytes, when compared to other tissues, play a crucial role in immune defence reactions in invertebrates (Söderhäll & Cerenius 1998). It is important to notice however that inhibition of bacterial growth by HLS was reported only when L-DOPA or PPD were added in assays. This suggests that natural PO substrates components have been inadvertently removed during HLS preparation, or alternatively that they are in insufficient amount in bacterial culture medium to produce cytotoxic compounds. These results differ from previous studies conducted in crustaceans and insects including the squat lobster *Galathea strigosa*, the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*, the common shrimp, *Crangon crangon*, the giant Antarctic isopod, *Glyptonotus antarcticus* and the locust *Locusta migratoria* where HLS were able to elicit an inhibitory effect on bacteria growth, in the absence of PO substrates (Rowley *et al.* 1990, Chisholm & Smith 1995).

In the presence of L-DOPA or PPD, bacterial growth stimulation was observed during the first hours of incubation and could be due to a stimulating effect of bacterial growth in the condition containing the sample and the Zobell medium versus the condition containing only the Zobell medium. Adding L-DOPA as substrate, antibacterial effects were observed as soon as 3h of incubation whereas PPD as substrate inhibited bacterial growth after only 6 h of incubation. Results with both strains, belonging to phylogenetically distinct units, suggest that PO-generated reactive intermediates could exert an effect on different oyster pathogens. Previous studies have reported that PO cascades may have not only antibacterial effects but also virucidal effects (Shelby & Popham 2006). Therefore, the effect of HLS and PO substrates in the presence of other bacteria or viruses, pathogens for *C. gigas*, could be further investigated.

Even if an antibacterial effect was observed for both *Vibrio* strains in the presence of HLS and PO substrates, it is noted that PO substrates may also be used by other enzymes such as peroxidases. Therefore, the next step in our study consisted on verifying that the inhibition of bacteria growth observed with HLS, and L-DOPA or PPD as substrates, was due to a PO-like activity. For this, we followed LGP32 growth in the presence of HLS, PO substrates, and the specific inhibitor of PO, PTU. Antibacterial effects were inhibited in the presence of PTU. These results are in agreement with previous studies carried out in

the amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense* where the antibacterial activity in presence of L-DOPA as substrate was inhibited in the presence of PTU (Li *et al.* 2001). Whether tyrosinase, catecholase or laccase are implicated in L-DOPA reactions remains unresolved. Previous studies suggest however the absence of tyrosinase-like activity and the presence of a laccase-like activity in haemocytes (Luna-Acosta *et al.* 2010a). Results with mushroom tyrosinase however did not help to elucidate this question. In the current study, tyrosinase could not be monitored because darkening of the wells in the assays. This darkening may have been due to phenoloxidase activity and melanin formation by tyrosinase (Smith & Söderhäll 1991). These results show the limits of spectrophotometrical techniques for bacterial growth survey. Other non spectrophotometrical-based techniques such as RT-qPCR or classical plating counting method on synthetic medium could be used in this type of studies. Furthermore, because of their high sensitivities, these techniques would allow to use low concentrated inocula which will in turn increase the sensitivity of the antimicrobial test (Saulnier *et al.* 2009b). Results with purified laccase from *Trametes versicolor* are similar to those obtained with HLS, suggesting that the antibacterial effect observed with L-DOPA as substrate is due to a laccase enzyme.

Antibacterial effects with PPD (1.50 mM) as substrate were higher than with L-DOPA (1.25 mM) as substrate. Results obtained with this substrate could be due also to the fact that in PPD oxidation reactions, reactive semiquinones are produced while in L-DOPA oxidation reactions quinones, which are more stable, are produced. Reactive semiquinones may react with O₂ to yield a superoxide radical (O₂^{•-}) that may contribute to the production of other semiquinones or other oxygen radicals, that can be deleterious for *Vibrio* species (Guillen *et al.* 1996). In both cases, these results suggest that phenoloxidase catalyzed reactions are an integral component of *C. gigas* defence system involving the production of intermediates, e.g. quinones, which kills invading microorganisms.

In order to confirm that the signal observed was due, in part, to a protein source, the next step in our study consisted on partially purifying HLS. Protein fractions obtained were tested for antibacterial activity in the presence of L-DOPA or PPD as substrates. Surprisingly, a significant antibacterial effect was observed in the presence of PPD substrate only, this effect being completely abolished after adding PTU. We hypothesize that the non significant antibacterial effect observed with L-DOPA (in the absence of PTU) is due to a partial loss of catecholase-type PO activity but not of laccase-type PO activity during HLS purification process, since, in the presence of the laccase substrate PPD, antibacterial activity was completely abolished by PTU, in crude and in partially purified HLS. Roles of laccases have been described in plants, fungi, bacteria and insects (Mayer 1987, Burke & Cairney 2002, Dittmer *et al.* 2004). However, this is the first time to the best of our knowledge that a laccase-type PO activity is shown to be implicated in immune defence mechanisms in a mollusc species. This can be related to the recent identification of a gene coding a multicopper oxidase/laccase in the Pacific oyster, *C. gigas* (Renault *et al.*, pers. com. - GenBank accession EU678320). Nevertheless, many questions remain unresolved. For example, whether the intracellular activities represent actual intracellular laccases, extracellular laccases in the process of being exported, or a

combination of the two, remains to be determined. Therefore, further studies on the role and mechanisms of action of laccases should be conducted in invertebrates, and more particularly in molluscs of high economic value such as *C. gigas*.

In summary, specific chemical inhibitor of PO or of proPO activation, PTU, and addition of the enzyme substrates L-DOPA or PPD, suggested that a constitutive innate antibacterial immune response attributable to the activity of PO is capable of limiting *V. splendidus* LGP32 and *V. aestuarianus* 02/041 infections in *C. gigas*, although this effect appears in our *in vitro* trial as transitional. Antibacterial effects could be due to products of the haemocyte enzyme PO cascade, including quinone, superoxide anion and hydrogen peroxide. Given the potentially important roles that these enzymes, in particular laccases, might play in bivalve immune defence mechanisms, more detailed investigation of their activities is clearly warranted.

Aknowledgments

This study was supported by a PhD grant from the Conseil Général of the Charente-Maritime for A. Luna-Acosta. The Conseil Régional de Poitou-Charentes is acknowledged for financial support through the research project 'POLERON' (Modifications chimiques de polluants organiques dans le bassin de Marennes-Oléron, toxicité des produits de dégradation sur l'huître creuse).

References

- Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Le Floch, S., Renault, T., 2008a. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicol. in Vitro.* 22, 1610-1617.
- Bado-Nilles, A., Le Floch, S., Renault, T., Faury, N., Auffret, M., Quentel, C., Thomas-Guyon, H., 2008b. Effects of two oils on immune parameters and on the expression of immune related genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In: *Physiomar*,
- Burke, R., Cairney, J., 2002. Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza.* 12, 105-116.
- Cerenius, L., Lee, B., Söderhäll, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29, 263-271.
- Chase, M., Raina, K., Bruno, J., Sugumaran, M., 2000. Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidases from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 953-967.
- Cheney, D., Macdonald, E., Elston, R., 2000. Summer mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington. *J. Shellfish Res.* 19, 353-359.
- Chisholm, J., Smith, V., 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustaceans species. *Comp. Biochem. Phys. A.* 110, 39-45.
- Dittmer, N., Suderman, R., Jiang, H., Zhu, Y., Gorman, M., Kramer, K., Kanost, M., 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 29-41.
- FAO, 2010. *Aquaculture Production: Quantities 1950-2008.* Fishstat Plus

- Fenoll, L., Rodriguez-Lopez, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., Tudela, J., 2002. Unification for the expression of the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *Int. U. Biochem. Mol. Biol. Life.* 54, 137-141.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2004. *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish Shell. Immunol.* 16, 501-512.
- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M., Nicolas, J., 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.* 53, 187-196.
- Gay, M., Renault, T., Pons, A., Le Roux, F., 2004. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis. Aquat. Organ.* 62, 65-74.
- Guillen, F., Martinez, M., Munoz, C., Martinez, A., 1996. Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 339, 190-199.
- Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish Shell. Immunol.* 22, 433-440.
- Huvet, A., Herpin, A., Dégremont, L., Labreuche, Y., Samain, J., Cunningham, C., 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene.* 343, 211-220.
- Jordan, P., Deaton, L., 2005. Characterization of phenoloxidase from *Crassostrea virginica* hemocytes and the effect of *Perkinsus marinus* on phenoloxidase activity in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Geukensia demissa*. *J. Shellfish Res.* 24, 477-482.
- Li, G., Zhang, S., Li, H., 2001. Ultrastructural localization and antibacterial activity of phenoloxidase in amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. *J. Marine Biol. Assoc. United Kingdom.* 81, 705-706.
- Luna-Acosta, A., Bustamante, P., Godefroy, J., Fruitier-Arnaudin, I., Thomas-Guyon, H., 2010a. Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed *in situ*. *Env. Sci. Pol. Res.* 17, 999-1008.
- Luna-Acosta, A., Rosenfeld, E., Amari, M., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H., 2010b. First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shell. Immunol.* 28, 719-726.
- Luna-Gonzalez, A., Maeda-Martinez, A., Vargas-Albores, F., Ascencio-Vallea, F., Miguel Robles-Mungaraya, M., 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shell. Immunol.* 15, 275-282.
- Mayer, A., 1987. Polyphenol oxidases in plants - recent progress. *Phytochemistry.* 26, 11-20.
- Nicolas, J., Renault, T., Gagnaire, B., Garcia, C., Garnier, M., Gay, M., Labreuche, Y., Le Roux, F., Miossec, L., Pepin, J., Saulnier, D., 2007. Les risques associés aux pathogènes. In: Samain, J., McCombie, H. (Eds.), *Mortalité estivale de l'huître creuse Crassostrea gigas: Défi MOREST*, pp. 229-269
- Peters, R., Raftos, D., 2003. The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture.* 223, 29-39.
- Rowley, A., Brookman, J., Ratcliffe, N., 1990. Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust, *Locusta migratoria*, in antimicrobial activity. *J. Invert. Path.* 56, 31-38.
- Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F., 1995. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1247, 1-11.
- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., 2009a. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiological studies. *J. Microbiol. Methods.* 77, 191-197.

- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M., Garcia, C., 2009b. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microb. Ecol.* 59, 787-798.
- Shelby, K., Popham, H., 2006. Plasma phenoloxidase of the larval tobacco budworm, *Heliothis virescens*, is virucidal. *J. Insect Sci.* 13, 1-12.
- Smith, P., Khron, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provanzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., Goeke, N., Olson, B., Klenk, D., 1985. Measurement of a protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Smith, V., Söderhäll, K., 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 15, 251-261.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 23-28.
- Solomon, E., Sunduran, U., Machonkin, T., 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96, 2563-2606.
- Thurston, C., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Soc. Gen. Microbiol.* 140, 19.
- Zar, J., 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New Jersey.

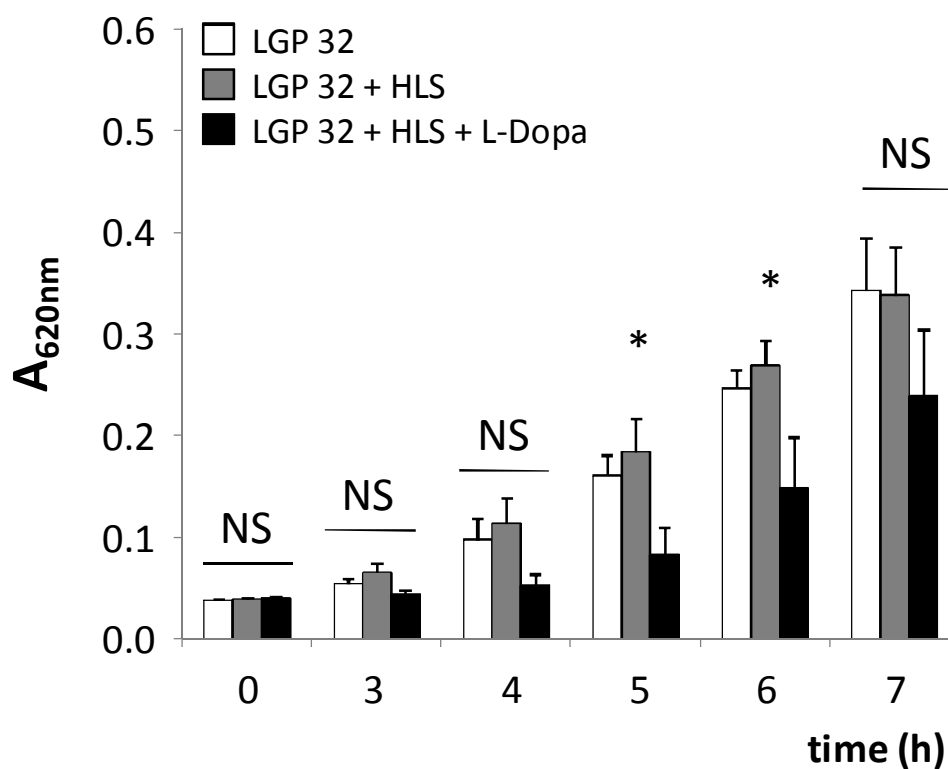


Figure 1 Effect of HLS on *V. splendidus* LGP32 growth, with or without L-DOPA (1.25 mM). Absorbance readings were taken from the cultures at different intervals and plotted against time. Mean \pm SEM A_{620nm} , n=9 (3 replicates of 3 pools of 10 oysters), N= 3 experiment replicates. *= statistical difference for $p < 0.05$ between 'LGP 32' and 'LGP32+HLS+L-Dopa' conditions.

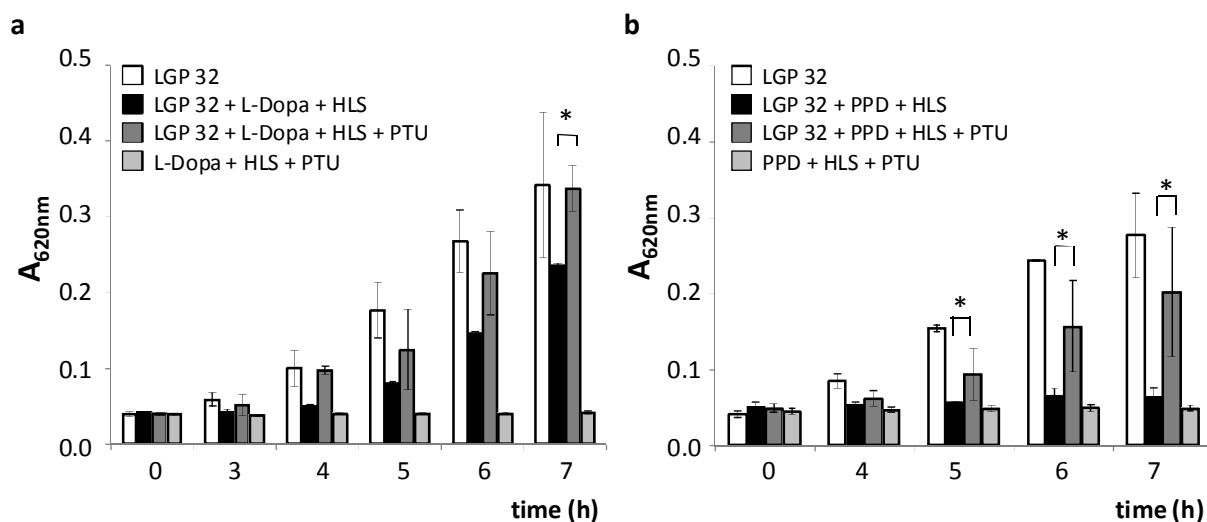


Figure 2 Effect of crude HLS and the specific PO inhibitor, PTU, on *V. splendidus* LGP32 growth, with 1.25 mM L-DOPA (a) or with 1.50 mM PPD (b) as substrates. Absorbance readings were taken from the cultures at different intervals and plotted against time. Mean \pm SEM A_{620nm} , n=9 (3 replicates of 3 pools of 10 oysters), N= 3 experiment replicates. *= statistical difference for $p < 0.05$ between 'LGP 32+substrate+HLS' and 'LGP 32+substrate+HLS+PTU'.

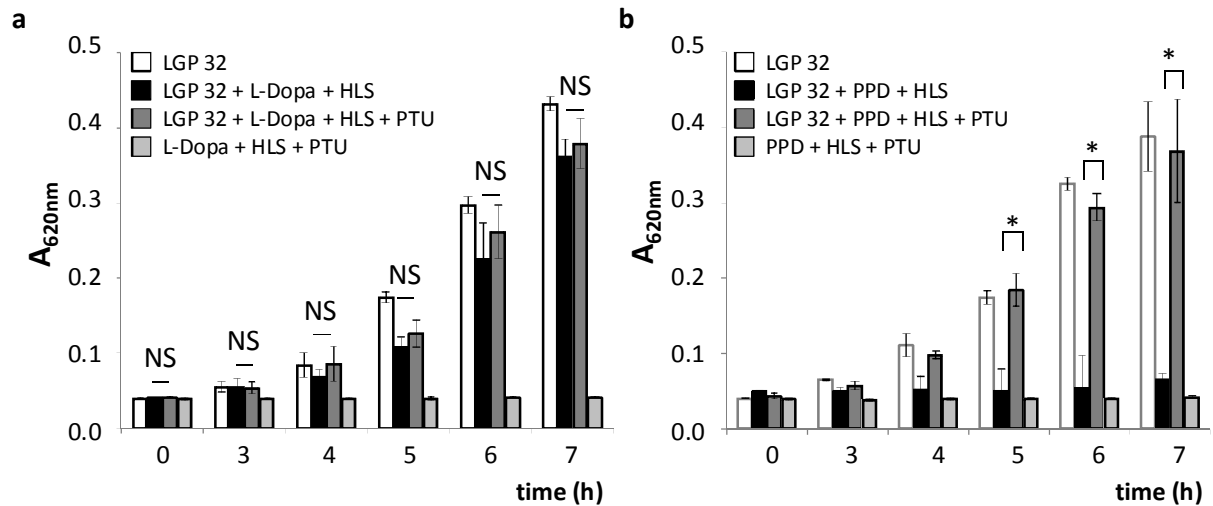


Figure 3 Effect of protein fractions from partially purified HLS and PTU on *V. splendidus* LGP32 growth, with 1.25 mM L-DOPA (a) or with 1.50 mM PPD (b) as substrates. Absorbance readings were taken from the cultures at different intervals and plotted against time. Mean \pm SEM A_{620nm} , $n=9$ (3 replicates of 3 pools of 10 oysters), $N=3$ experiment replicates, $n=9$, *= statistical difference for $p<0.05$ between 'LGP 32+substrate+HLS' and 'LGP 32+substrate+HLS+PTU'.

Table 1 Effect of PO-generated reactive intermediates on *V. splendidus* LGP32 and *V. aestuarianus* 02/041 growth, with L-DOPA (1.25 mM) and PPD (1.50 mM) as substrate. Inhibition due to laccase from *Trametes versicolor* or to HLS (in %) corresponded to: $[1 - (\text{absorbance 'bacteria + sample + substrate'} / \text{absorbance 'bacteria + substrate'})] * 100$. Mean \pm SD, n=9, *= statistical difference (p<0.05) between the conditions 'bacteria + substrate + sample' and 'bacteria + substrate'. Negative values correspond to bacterial growth stimulation.

Treatments	Time (h)	0	3	4	5	6	7
LGP 32 + laccase from <i>T. versicolor</i> + L-Dopa (1.25 mM)		-37 \pm 7	12 \pm 17	13 \pm 10	37 \pm 11 *	37 \pm 10 *	33 \pm 3 *
LGP 32 + HLS + L-Dopa (1.25 mM)		-4 \pm 7	21 \pm 8 *	43 \pm 15 *	48 \pm 15 *	45 \pm 14 *	28 \pm 14 *
LGP 32 + HLS + PPD (1.50 mM)		-16 \pm 7	-15 \pm 9	-14 \pm 3	-2 \pm 14	18 \pm 1 *	29 \pm 1 *
02/041 + HLS + L-Dopa (1.25 mM)		3 \pm 4	N.D.	3 \pm 8	20 \pm 18 *	31 \pm 22 *	31 \pm 24 *
02/041 + HLS + PPD (1.50 mM)		-31 \pm 7	-22 \pm 2	-17 \pm 6	-14 \pm 6	4 \pm 6	30 \pm 6 *

N.D. Not determined

Table 2 Catecholase- and laccase-type phenoloxidase specific activities (in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$) in crude and partially purified fractions of proteins from haemocyte lysate supernatant, by using dopamine (100 mM) and PPD (50 mM) as substrates, respectively. Values represent the average of three replicates \pm standard deviation (n=9). HLS: haemocyte lysate supernatant.

Sample	Substrate	
	Dopamine (100 mM)	PPD (50 mM)
Crude fraction of HLS	310.22 \pm 21.15	164.68 \pm 50.44
Partially purified fraction of HLS	133.10 \pm 25.82	50.44 \pm 4.31

Annexe 5 : Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofene) on immunological parameters of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, spat

Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofen) on immunological parameters of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, spat

A. Luna-Acosta^{1,*}, T. Renault^{2,*}, N. Faury², D. Saulnier², I. Fruitier-Arnaudin¹, P. Bustamante¹, H. Budzinski³, K. Le Menach³, N. Tapie³, H. Thomas-Guyon¹

¹ Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges - F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

² Ifremer, Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), Ronce-les-Bains, 17390 La Tremblade, France

³ Laboratoire de Physico-ToxicoChimie des systèmes naturels (LPTC), UMR5255, CNRS-Université de Bordeaux 1, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France

* Corresponding authors: A. Luna-Acosta and T. Renault
Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs),
UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle,
2 rue Olympe de Gouges
F-17042 La Rochelle Cedex 01, France
Email : aluna1508@yahoo.com
Tel : +33 (0)5 46 50 76 23
Fax : +33 (0)5 46 50 76 63
Ifremer - Laboratoire de Génétique et Pathologie
17390 La Tremblade
Tel: 33 (46 76 26 10
Fax: 33 5 46 76 26 11
Email: trenault@ifremer.fr

Abstract

During the last decade, an increase of massive summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, and more particularly of juveniles, have been observed in various regions of the world. Summer mortality is likely caused by a weakening of *C. gigas* immune defences, probably caused by multiple co-factors, including aquaculture practices, temperature variations, physiological stress, pathogens and contaminants. Among these multiple factors, different types of contaminants have shown to affect immune defence capacities in aquatic organisms. In this context, the aim of this study was to investigate early effects on immune parameters in *C. gigas* oysters exposed to *i*) diuron at 1 µg.l⁻¹ for 24h and *ii*) to a mixture of diuron, isoproturon and ibuprofen (at 5 µg.l⁻¹ each). Since 2 hours of exposure to diuron at 1 µg.l⁻¹, the underexpression of different genes implicated in immune defence mechanisms in the haemocytes and the inhibition of enzyme activities such as laccase-type phenoloxidase (PO) were observed. The inhibition of superoxide dismutase (SOD) activity in the plasma was also observed after 6 and 24 hours of exposure. In the mixture with diuron, isoproturon and ibuprofen, catecholase-type PO activity in the plasma and the percentage of phagocytosis in the haemocytes were diminished after 6 hours of exposure. Thus, results showed that early effects on molecular, biochemical and cellular parameters can be detected in the presence of these contaminants, giving an insight of their potential effect in situations that can be found in natural environments, i.e. relatively high concentrations but for short periods of time.

Key words: bivalve - pollution - gene expression - laccase - superoxide dismutase – phagocytosis

1. Introduction

Estuaries are among the most ecologically and economically productive environments in the world, by serving as feeding grounds for migratory waterfowls, as nurseries for juvenile fish and invertebrate larvae, and by providing shelter for many types of benthic organisms (Johnston 1981). Among important species inhabiting these zones, the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* is the leading aquaculture product at the worldwide level (FAO 2010). However, high mortalities of this species have been observed in summer on French coasts as well as in other regions of the world (Renault et al. 1994, Soletchnik et al. 2003, Soletchnik et al. 2005, Samain et al. 2007). It has been suggested that these mortality events are related to a weakening of *C. gigas* immune defences (Cheney *et al.* 2000), probably caused by multiple co-factors, including aquaculture practices, temperature variations, physiological stress, pathogens and contaminants.

Among these multiple stressors, aquatic habitats are particularly subject to contamination by herbicides, *via* runoff, leaching, spray drift or accidental spills. The most widely used herbicides in agriculture are substituted urea herbicides (Barbash 1999), which can also be used as algicides in paints and coatings (Gerecke et al. 2002). These herbicides block electron transfer at photosystem II of photosynthetic microorganisms and plants and, as a consequence, oxidation reactions in excess of those normally tolerated by the cell occur, and the plant dies (Dodge 1989). Substituted urea herbicides such as diuron and isoproturon are included in the list of priority contaminants of the EU Water Framework Directive (European Commission 2000), and in the case of diuron, concentrations up to 6.7 $\mu\text{g.l}^{-1}$ have been found in coastal waters (Thomas et al. 2001). Due to its toxicity, the use of diuron has been forbidden by French policies since 2008. However, a recent study reported the presence of diuron on French aquatic environments, confirming its persistence despite restriction policies (Pesce et al. 2010).

In addition to that, other contaminants such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, e.g. ibuprofen), are only partially removed in wastewater treatment plants (WWTP), and thus, can be present in the marine environment (ASCI ENCE 2005). Ibuprofen is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs). It inhibits cyclooxygenase (COX), the enzyme that converts arachidonic acid to prostaglandin H_2 (PGH_2), which is converted by other enzymes into other prostaglandins (mediators of pain, inflammation and fever) and into thromboxane (Rao & Knaus 2008). This pharmaceutical has been detected at concentrations that go up to 1.3 $\mu\text{g.l}^{-1}$ in WWTP effluent and marine seawater samples where herbicides are present at high concentrations, suggesting that experimental approaches with toxicant mixtures are needed (Muñoz *et al.* 2009).

Herbicides such as diuron, isoproturon and atrazine have shown to exert an effect on immune parameters of *C. gigas* at a molecular, a biochemical, and a cellular level (Bodin et al. 2004, Tanguy et al. 2005, Gagnaire et al. 2007), but little is known on the effects of pharmaceuticals such as ibuprofen on marine bivalves (Gagne et al. 2004, Gagne et al. 2006, Ericson et al. 2010). Moreover, most of exposure experiments have been carried out

by exposing adult *C. gigas* to relatively long periods of time, i.e. from one week to one month (Bodin et al. 2004, Tanguy et al. 2005, Gagnaire et al. 2007), giving an insight on effects of chronic exposures on physiological functions. However, little is known on the effects of environmentally relevant concentrations for short periods of time (Buisson *et al.* 2008). Indeed, it is well known that in natural waters, uneven concentrations of pesticides are found in the seawater mass because of different factors such as seasonal agricultural practices and weathering processes (rainfall, photodegradation, volatilization), and peak concentrations are often found in the coastal environment for short periods of time (Munaron 2004, Samain et al. 2007). Thus, short-term or pulse exposures to these types of contaminants in aquatic animals, particularly in juveniles that are known to be generally more sensitive to environmental stress than adults (Perdue et al. 1981), appear more widespread than sustained exposure (Burgoa & Wauchope 1995).

In this general context, the aim of this work was to study the short-term responses on immune parameters of juvenile *C. gigas* in experimental conditions at molecular, biochemical and cellular levels, by exposing oysters (*i*) to diuron at $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ for 24h, and (*ii*) to a mixture of 2 herbicides and one pharmaceutical, i.e. diuron ($5 \mu\text{g.l}^{-1}$), isoproturon ($5 \mu\text{g.l}^{-1}$) and ibuprofen ($5 \mu\text{g.l}^{-1}$).

2. Materials and methods

2.1. Oysters

Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, spat less than 1 year old were purchased from commercial shellfish nursery located in Vendée (France). Oysters were acclimatized in the laboratory at $19 \pm 1^\circ\text{C}$ during two weeks before starting experiments. During summer mortality events, water temperatures are often over a value of 19°C (Soletchnik et al. 2005). Animals were fed daily with $5 \cdot 10^4 \text{ cell.ml}^{-1}$ of *Heteroskeletonema sp.* (Bacillariophyceae).

2.2. Contaminants

Stock solutions of diuron (1-(3,4 dichlorophenyl)-3,3-dimethyl urea) and isoproturon (3-(4-isopropylphenyl)-1,1-dimethylurea) from Sigma-Aldrich, France (Table 1) were prepared in ethanol 80% (Gagnaire 2005). Stock solution of ibuprofen (α -methyl-4-(2-methylpropyl)-benzenacetic acid) from Sigma-Aldrich, France (Table 1) was prepared in ultra pure quality water (mili-Q). Diuron, isoproturon and ibuprofen were added to the tanks in the form of diluted solutions allowing spikes of small volumes. All the experiments were conducted under dark conditions.

2.3. Experimental design

2.3.1. Experiment conducted with diuron at 1 µg.l⁻¹

Two groups of 70 oysters were exposed to diuron (1 µg.l⁻¹) for a period of 24h and under dark conditions. Two control tanks contained 70 oysters in the presence of 50 l fresh seawater. The experiment was repeated three times.

2.3.2. Experiment conducted with diuron, isoproturon and ibuprofen

Two groups of 70 oysters were exposed to a cocktail of 2 herbicides and one pharmaceutical at concentrations of diuron (5 µg.l⁻¹), isoproturon (5 µg.l⁻¹) and ibuprofen (5 µg.l⁻¹), detected in aquatic environments (Thomas et al. 2001, Heberer 2002, Munaron et al. 2006). Two control tanks contained 70 oysters in the presence of 50 l fresh aerated seawater. Animals were exposed for a period of 6h under dark conditions. The experiment was repeated four times.

2.4. Sampling procedures

2.4.1. Seawater sampling

In trials conducted with diuron, 50 ml of seawater were collected at 0 and 24 of exposure in one of the two contaminated tanks.

In trials conducted with diuron, isoproturon and ibuprofen, 50 ml of seawater were collected at 0, 1, 3 and 6 hours of exposure in one of the two contaminated tanks.

2.4.2. Haemolymph collection

After carving a small notch in the dorsal shell of the oyster, 0.3 to 0.5 ml of haemolymph were withdrawn from the adductor muscle sinus with a 1-ml syringe equipped with a needle (0.9 x 25 mm). Haemolymphs from 10 oysters from each of the two exposure tanks were pooled to obtain a sufficient volume of haemolymph, i.e. one pool corresponds to the haemolymph of 20 oysters, with 10 oysters collected per tank. Haemolymph samples were filtered through a 60 µm mesh to eliminate aggregates and kept on ice.

For flow cytometry and spectrophotometry measurements, 1 ml of haemolymph from each pool was collected, 400 µl of haemolymph were collected immediately to study cell mortality and phagocytosis activity by flow cytometry and remaining haemolymph pool samples were centrifuged (260 x g, 10 min, 4°C) and the acellular fraction (supernatant) was frozen at -80°C for further enzymatic analysis.

For gene expression analysis, remaining haemolymph from initial pool samples was centrifuged (1500 x g, 10 min, 4°C) and 1 ml of Trizol[®] was added to the cell pellets. The mix was frozen at -80°C until further extraction.

2.5. Seawater and oyster contaminant concentrations

For trials carried out with diuron alone, concentrations of diuron and metabolite (1-(3,4 dichlorophenyl urea (DCPU)) were determined in the seawater and in a pool of 5 oysters per treatment, at 0, 2 and 24h of exposure for one experiment. Analyses were performed by the Idhesa laboratory (Brest, France), using on-line solid-phase extraction coupled with liquid chromatography and electrospray ionization-tandem mass spectrometry (HLC Waters separation module 2690, Waters photodiode array 996 detector, Micromass® Quattro Ultima™ mass spectrometer). The detection limit was 0.02 µg.l⁻¹ for water samples, 0.2 µg.kg⁻¹ for diuron, and DCPU in oyster.

For trials conducted with the 3 contaminant mixture (diuron, isoproturon and ibuprofen), analyses were carried out in two of the four experiment replicates conducted for this study. Contaminants were extracted via solid-phase extraction (SPE), using Oasis HBL (for herbicides) or MCX cartridges (for ibuprofen) and analyzed by LC/MS/MS. The analytical procedures were adapted from Alder et al (2006) for herbicides and from Togola & Budzinski (2008) for ibuprofen. Briefly, for herbicide extraction, samples were eluted with 2 x 3 ml methanol. Then, they were concentrated with a rotary evaporator (50°C), and then under a gentle flow of nitrogen, until having a final volume of ~100 µl. For ibuprofen extraction samples were eluted with 3 ml ethyl acetate, 1 ml ethyl acetate/acetone (50/50 v/v) and 1 ml dichloromethane/methanol (50/50 v/v) with 5% of ammonium hydroxide. They were concentrated with a rotary evaporator (50°C) under a gentle flow of nitrogen. Then, 5 µl of methanol were added and samples were concentrated a second time with the rotary evaporator and the flow of nitrogen. Diuron, isoproturon and ibuprofen were quantified relative to the perdeuterated internal standards (Sigma-Aldrich, France) introduced at the beginning of the sample preparation procedure. Procedural blanks using ultra pure water were also prepared in the same conditions in order to test the potential influence of the extraction process.

Agilent (Palo Alto, CA, USA) supplied the 1100 Series HPLC system connected to a quadrupole 1100 mass spectrometer. The ionization mode was positive atmospheric pressure chemical ionization for all analytical compounds. Data were processed by a Hewlett-Packard Chemstation software (Palo Alto, CA, USA).

2.6. Flow cytometry analysis

Haemocyte mortality and phagocytosis percentage were analyzed with an EPCIS XL 4 (Beckman Coulter) flow cytometer as previously described (Gagnaire et al. 2006). For each sample, 3 000 events were counted. Results were depicted as cell cytograms indicating cell size (FSC value) and cell complexity (SSC value) and the fluorescence channel(s) corresponding to the marker used. Recorded fluorescence depended on the monitored parameters: cell mortality was measured using red fluorescence while phagocytosis was measured using green fluorescence. Mortality was quantified using 200 •l of haemocyte

suspension. Haemocytes were incubated in the dark for 30 min at 4°C with 10 µl of propidium iodide (PI, 1.0 mg.l⁻¹, Interchim). Phagocytosis was measured by ingestion of fluorescent beads. Two hundred µl of haemocyte suspension were incubated 1 h in the dark at ambient temperature with 10 µl of a 1/10 dilution of Fluorospheres[®] carboxylate-modified microspheres (diameter 1 µm, Interchim).

2.7. Enzymatic analysis

Catecholase-type and laccase-type PO activities were determined according to the method of Asokan et al. (1997), with slight modifications (Luna-Acosta *et al.* 2010). Briefly, catecholase activity was followed by monitoring the increase of absorbance at 490 nm for 4 h, by using dopamine as substrate. Laccase activity was followed by monitoring the increase of absorbance at 420 nm for 2 h, by using p-phenylenediamine (PPD, Sigma-Aldrich, France) as substrate. One unit of catecholase activity and one unit of laccase activity correspond to the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 µmole of product per minute (Pomerantz 1963, Fenoll *et al.* 2002).

SOD activity was determined by an indirect method (Therond et al. 1996), based on competition of SOD with iodinitrotetrazolium (INT) for dismutation of superoxide anion (O₂⁻). In the presence of O₂⁻, INT is reduced into a red formazan dye that can be measured at 505 nm at 25°C (Kit Ransod SD 125, Randox, France). One unit of SOD is defined as the amount of enzyme that promotes a 50% decrease in the rate of INT reduction.

All enzymatic activities were carried out in triplicate for each sample and were expressed in relation to protein concentration measured according to the Lowry method with slight modifications, by using bicinchoninic acid and copper sulphate 4% (Smith *et al.* 1985). Serum albumin was used as standard (Sigma-Aldrich, France).

2.8. Oyster gene expression in haemocytes

2.8.1. Gene selection

Seven immune-related genes previously identified from *C. gigas* cDNA database were selected, i.e. laccase, macrophage expressed protein 1-like (MAC), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), superoxide dismutase (SOD), lipopolysaccharide-binding protein (LBP)/mammalian bactericidal/permeability-increasing protein (LPS/BPI), tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) and lysozyme, and the Elongation factor I (EF I) gene was used as reference (Table 2).

2.8.2. Total RNA extraction and reverse transcription

Samples were treated with the RQ1 RNase-free DNase (Promega) to remove DNA. The quality of extracted RNA was checked on 1% agarose gel. RNA concentrations and purity were measured again by absorption spectrophotometry (A_{260 nm}).

Reverse transcription (RT) of extracted haemocyte RNA (500 ng) was carried out by using SuperScript™ III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen), and following manufacturer's recommendations, i.e. using oligo(dT)₂₀ (Invitrogen), 10 mM of dNTP (Invitrogen) and RNaseOUT™ recombinant RNase Inhibitor (40 units.µl⁻¹, Invitrogen).

2.8.3. Real-time PCR analysis

The relative levels of gene transcripts were investigated by real-time PCR using an MX3005P® Stratagene. cDNA were diluted at 1/30 with sterile ultra pure quality water before use. Real-time PCR was performed in triplicates with 5µl of cDNA, 12.5 µl of Brilliant SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene®), 2.5 µl of sterile water, and 2.5 µl of each specific primer pair (Eurogentec S.A.; Table 2), for a total volume of 25 µl. Amplification of a specific cDNA (Elongation factor I, coefficient of variation < 5%) was performed to confirm the steady-state mRNA expression of a housekeeping gene, allowing an internal control for gene transcription. Each microplate includes negative control (RNA treated with DNase) and blank control (sterile water).

The cycling conditions consisted of Taq polymerase thermal activation (10 min, 95°C) followed by 40 cycles of denaturation (30 s, 95°C), annealing (1 min, 60°C) and elongation (1 mn, 72°C). Finally, a melting curve of PCR product (60-95°C) was performed to ensure the production of a single specific product.

For each primer pair, PCR efficiency (*E*) was determined by constructing a standard curve from serial dilutions. *E* value needs to range from 90% to 110%. The cycle threshold (Ct) corresponded to the number of cycles at which the fluorescence emission monitored in real-time exceeded the threshold limit. Ct and *E* were obtained using the MX3000P® Stratagene software. The relative mRNA expression ratio for a considered gene was based on the PCR efficiency (*E*) and the Ct of the contaminated samples versus the control samples expressed in comparison to the reference gene (EF I) as described previously (Pfaffl 2001).

$$\text{Ratio} = \frac{(E \text{ studied gene})^{\Delta C_t \text{ studied gene(untreated-treated)}}}{(E \text{ reference gene})^{\Delta C_t \text{ reference gene(untreated-treated)}}$$

2.9. Statistics

For trials conducted with diuron alone, the experiment was repeated 3 times and each sample was triplicated. However, for one of the experiments the temperate in the seawater was at 15 ± 1°C and not at 19 ± 1°C. Previous studies have shown that effects of herbicides differ depending on the seawater temperature (Gagnaire 2005). Thus, only two of the three experiments were taken into account for statistical analysis. For trials conducted with the three contaminants, the experiment was repeated four times and each sample was triplicated.

All values are reported as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was carried out with STATISTICA 7.0. Values were tested for normality (Shapiro test) and homogeneity of variances (Bartlett test). In some cases, logarithmic transformations (Log_{10}) were used to meet the underlying assumptions of normality and homogeneity of variances. For haemocyte parameters, results were expressed as the percentage of positive cells. Values were normalized using an r angular arcsinus $\sqrt{}$ (percentage of positive cells) transformation before analysis. Differences in immune parameters were compared using two-way nested ANOVA, with treatment and time as fixed factors, and pool as random factor. Pool was nested within each combination of treatment and time (Zar 1984). When the null hypothesis (H_0 : no difference between treatments or within treatment at different time intervals) was rejected, significant differences were tested using Tukey's HSD test. For non normal values, i.e. to compare seawater contaminant concentrations, a Kruskal-Wallis test was used, followed by a Dunn's multiple comparisons test. For real-time PCR analysis, statistical differences in gene expression between conditions were evaluated in group means by randomisation tests (Pfaffl et al. 2002) using REST-384[®] software and Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test[®]. Two thousand random allocations were performed and significant differences were considered at $p < 0.05$. Statistical significance was designed as being at the level of $p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$.

3. Results

3.1. Experiment conducted with diuron ($1 \mu\text{g.l}^{-1}$)

3.1.1. Concentration in seawater and in oyster tissues

In the control tank, diuron was not detected either in seawater or in oyster soft tissues. In the tanks spiked with diuron, concentrations of waterborne diuron were 20% lower than the nominal diuron concentration at the beginning of the experiment. Thus, oysters were effectively exposed to $0.8 \mu\text{g diuron.l}^{-1}$ (Table 3). After 24h experiment, seawater diuron concentrations decreased by 21 %.

In oysters, at 2h and 24h of exposure, diuron concentrations in oyster soft tissues were $9.2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ and $10.8 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectively (Table 3), showing an increase of 18% in this period time. As the mean dry weight of soft tissues per oyster was of $1.48 \pm 0.17 \text{ g}$, each oyster contained $0.016 \mu\text{g}$ of diuron at the end of the exposure period. If we consider that all oysters, from the beginning to the end of the experiment, possessed $\sim 0.016 \mu\text{g}$ of diuron, this means that 0.016×70 individuals per tank = $1.12 \mu\text{g}$ of diuron from seawater were present in oysters, which represents 3% of the initial quantity of diuron in the seawater. The metabolite DCPU was not detected in oysters nor in seawater, independently of the time of exposure (Table 3).

3.1.2. Effects on enzyme activities

Exposure to diuron at 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ did not affect significantly the catecholase activity in comparison to the control condition (data not shown). However, significantly lower activities were observed for laccase activities at 2 and 6h (decrease of ~40% and ~50%, respectively; Fig. 1a). Significantly lower activities, in comparison to control, were also observed for SOD activities at 6 (decrease of ~15 %) and 24h (decrease of ~30%) of exposure (Fig. 1b).

3.1.3. Effect on gene expression

Over 24h experiment, exposure to diuron at 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ did not affect significantly the relative mRNA expression of SOD gene (Fig. 2). Significantly lower relative mRNA expressions in comparison to controls were observed for laccase (0.40 ± 0.10), MAC (0.23 ± 0.24), LPS/BPI (0.21 ± 0.22) and TIMP (0.63 ± 0.15) genes at 2h, for MYD88 gene at 6h (0.36 ± 0.39), and for laccase and TIMP genes at 24h (0.51 ± 0.33 and 0.65 ± 0.18) of exposure. Significantly higher relative mRNA expressions in comparison to controls were observed for lysozyme gene at 2h (1.26 ± 0.06) and for laccase gene at 6h (2.04 ± 0.29).

3.2. Experiments conducted with a mixture of 5 $\mu\text{g diuron.l}^{-1}$, 5 $\mu\text{g isotroturon.l}^{-1}$ and 5 $\mu\text{g ibuprofen.l}^{-1}$

Concentrations of diuron, isotroturon and ibuprofen slightly decrease during the time course of the experiment i.e., 6h (data not shown). However; no significant differences were observed in diuron, isotroturon and ibuprofen concentrations in the water column over time in the presence or in the absence of oysters (data not shown). Diuron mean concentration from the different times of exposure (i.e. 0, 1, 3, 6h) of $9.2 \pm 0.5 \mu\text{g.l}^{-1}$ was significantly ($p < 0.05$) higher than isotroturon and ibuprofen mean concentrations of, 6.8 ± 0.5 and $4.8 \pm 0.3 \mu\text{g.l}^{-1}$, respectively.

No significant differences were observed on cellular mortality during the whole experiment (data not shown). A significant inhibitory effect was observed after 6h of exposure on phagocytosis and on catecholase activity (Fig. 3). In comparison to the control condition, phagocytosis was inhibited by almost 50% and catecholase activity was inhibited by ~20%.

4. Discussion

4.1. Chemical analysis

The aim of this work was to study the short-term responses on immune parameters of juvenile *C. gigas* of a single herbicide or of a mixture of these herbicides and other contaminants that can be present with this contaminants in the marine environment. To this end, all the experiments were conducted under dark conditions since some studies have

shown that diuron can be degraded by photolysis, e.g. diuron presents a half-life of 5h in the presence of natural sunlight and 5 mM of NO_3^- (Shankar *et al.* 2008).

Experiments in which diuron was tested alone were carried out for a 24h period. As 28.7 μg of diuron were present at the beginning of the study in contaminated tanks, this means that, in theory, $28.7/70 = 0.41 \mu\text{g}$ are available per oyster in a 50 l tank. By taking into account the theoretical filtration rate, i.e. $1.7 \text{ l.oyster}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Table 3), an oyster can filtrate $0.41 \mu\text{g} * 1.7 \text{ l}/50 \text{ l}^{-1}.\text{h}^{-1} = 0.014 \mu\text{g}$ of diuron per hour. This result is similar to the quantity of diuron found in oysters at 2h and 24h of exposure, i.e. 0.014 and 0.016 μg . The theoretical quantity of diuron that oysters were able to integrate in 1 hour, was present in their tissues 2h after the beginning of the experiment. However, no significant increase was observed at 24h of exposure. These results demonstrate that a 2h exposure is sufficient to detect diuron in oyster tissues and that oysters present no potential to strongly bioaccumulate diuron in so short exposure period.

Some degradation products of diuron, such as DCPU, DCPMU (1-(3,4-dichlorophenyl)-3-methyl urea) and DCA (3,4-dichloroaniline) have been reported to be more toxic than diuron (Giacomazzi & Cochet 2004). No traces of DCPU were found in oyster soft tissues. If we consider that all oysters, from the beginning to the end of the experiment, possessed $\sim 0.014 \mu\text{g}$ of diuron, this means that $0.014 \mu\text{g} * 70 \text{ oysters} = 1 \mu\text{g}$ of diuron from seawater were present in oysters, which represent 2% of the initial quantity of diuron in the seawater. By the end of the experiment 21% of diuron was lost, which means that, if 2% was present in oysters, 19% disappeared by volatilization or adsorption to the walls of the tank. However, diuron is a molecule mostly found in the aqueous phase and is non volatile (Gramatica & Di Guardo 2002). Thus, the disappearance of diuron in the water column could be explained by a metabolization of diuron by oysters into compounds, other than DCPU, such as DCPMU or DCA, that were not measured in oyster soft tissues of the present study (Giacomazzi & Cochet 2004).

In the present study, oysters presented a bioconcentration factor (BCF) for diuron of 17. In a previous study, experiments carried out with 21-month-old *C. gigas* oysters exposed to diuron ($1 \mu\text{g}.\text{l}^{-1}$), led to an accumulation of diuron of $7.27 \mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ wet flesh (Buisson *et al.* 2008), and to a BCF of ~ 7 , confirming that a 24h exposure is sufficient to detect diuron in oyster soft tissues and that oysters present a low potential to bioaccumulate diuron.

No significant differences were observed on diuron, isoproturon or ibuprofen seawater concentrations during the 6h of exposure, suggesting that oysters were in contact with a steady concentration of the three contaminants during the whole experiment. The fact that in the present study concentrations of contaminants did not vary with time suggests that no loss was due (i) to adsorption of contaminants to the walls of the tanks used for the experiments, (ii) to volatilization or (iii) to photolysis processes.

4.2. Effects of diuron

Trials conducted with diuron alone showed that effects on gene expression can be observed very rapidly. However, the variations reported for gene expression remained low. Laccase gene was underexpressed at 2h, overexpressed at 6h and underexpressed again at 24h. The overexpression observed at 6h, could be an internal response (homeostasis) to compensate the underexpression that occurred at 2h. However, at 24h the expression was repressed again, suggesting that overcompensation observed at 6 hours is not sufficient to abolish diuron effects on gene expression. A down expression of MAC and LBP/BPI was also observed at 2h of exposure. The macrophage expressed protein is a perforin-like protein which has been reported in marine molluscs (Mah et al. 2004). This perforin-like protein is up-regulated by lipopolysaccharide (LPS) in the sponge, *Suberites domuncula*, and displays a bactericidal effect (Wiens et al. 2005) and the product of macrophage express protein 1-like gene appears as an important factor of innate immunity in different species (Mah et al. 2004). LBP/BPI complex and LGBP bind LPS and activate the pro-PO cascade (Mitta et al. 2005) implicated in immune humoral defence mechanisms in invertebrates (Söderhäll & Cerenius 1998). Thus, a down-regulation of these genes may lead to decrease of defence activities against pathogens. Similarly to the present study, a down-regulation of the LBP/BPI, TIMP and lysozyme gene expression has been reported in Pacific cupped oysters exposed to a mixture of eight pesticides (atrazine, glyphosate, alachlor, metolachlor, fosetyl-aluminium, tertbutylazine, diuron and carbaryl) at environmentally relevant concentrations over a 7-day period (Gagnaire et al. 2007). However, it is important to notice that in the present study, the effects on genes such as MAC, LPS/BPI and lysozyme disappeared at 6h of exposure. Similarly a down-regulation at 6h was observed for MyD88 gene, implicated on cell signaling (Wiens et al. 2005), but the effects disappeared at 24h. Thus, results of the present study suggest that diuron can exert rapid effects on immune parameters of *C. gigas*, but also that rapid acclimatization responses can take place in the organism.

POs are the key enzymes of melanization and are known to be implicated on invertebrate immune responses (Söderhäll & Cerenius 1998). This family of enzymes is composed of tyrosinases, catecholases and laccases and recently, the presence of catecholase and laccase activities in *C. gigas* were demonstrated (Hellio *et al.* 2007, Luna-Acosta *et al.* 2010). No significant effects were observed on catecholase activity in oysters exposed to diuron at 1 µg.l⁻¹ for 24 hours, while significant differences were observed in laccase activity. Differences on sensitivities to inhibitors have been reported in different enzymes. In the case of acetylcholinesterases, for example, which are known to be inhibited by pesticides, an acetylcholinesterase in the *C. gigas* has shown to be insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors (Bocquene et al. 1997). Diuron belongs to the N-phenylurea class of chemicals. The molecule 1-phenyl-2-thiourea (PTU) is known to be a specific inhibitor of all types of POs (Arias *et al.* 2003, Dittmer *et al.* 2004), so diuron, which is a phenylurea herbicide, may act as an inhibitor on laccase activity.

A significant decrease in the activity of the antioxidant enzyme SOD was also observed. Diuron is known to generate reactive oxygen species (ROS). Thus, diuron may cause an enhanced reactive oxygen species (ROS) accumulation and overwhelm the antioxidant system (Geoffroy et al. 2002).

These results are in agreement with studies carried out in adults of *C. gigas*, which revealed that the herbicide diuron can exert different effects in this marine bivalve, such as a transient effect on reproduction (partial spawning) and tissues (atrophy of the digestive epithelium) after 1 week of exposure at $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Buisson *et al.* 2008), and on aneuploidy and immune parameters after 4 weeks of exposure at 300 ng.l^{-1} and $3 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Bouilly *et al.* 2006).

4.3. Effects of a mixture of diuron, isoproturon and ibuprofen

In the present study, short-term experiments carried out with a mixture of diuron, isoproturon and ibuprofen, revealed that immune parameters such as phagocytosis and catecholase-type PO activities can be modulated very rapidly (i.e. in 6h) following a direct contact to waterborne contaminants. It is important to notice that no effect was observed in catecholase-type PO activity in the presence of diuron at $1 \mu\text{g.l}^{-1}$, while an effect in this PO activity was observed in the presence of diuron in a mixture with another herbicide and a pharmaceutical, highlighting the interest of studying the effect of single molecules but also of mixtures of contaminants that could be present at the same time in the marine environment. In addition to that, these results are in agreement with studies on the effect of herbicides on bivalves that have been carried out for longer periods of exposure and that have shown that a mixture of herbicides containing atrazine, diuron and isoproturon can diminish phagocytosis activity in *C. gigas* (Gagnaire et al. 2007).

5. Conclusion

Different studies on the effect of herbicides and pharmaceuticals in aquatic organisms have been carried out by exposing animals to relatively long periods of time (Auffret & Oubella 1997, Pomati *et al.* 2004, Tanguy *et al.* 2005, Bouilly *et al.* 2007, Buisson *et al.* 2008, Ericson *et al.* 2010), giving an insight on the effects of chronic exposures on physiological functions of the organism. Nevertheless, it is well known that in natural waters, uneven concentrations of contaminants are found in the water mass because of different factors such as seasonal agricultural practices and weathering processes (rainfall, photodegradation, volatilization), and peak concentrations are often found in the aquatic environment for short periods of time (Munaron *et al.* 2006, Hyne & Aistropé 2008). Results of the present study are in agreement with studies where short-term exposures of herbicides have shown to exert an effect on aquatic organisms (e.g. Saglio & Trijasse 1998, Bretau et al. 2000). Thus, short-term exposures under laboratory controlled conditions can give an insight of the potential effect of contaminants in organisms in the natural environment. However, it is difficult at this stage to differentiate if the observed responses corresponded to acclimatization (homeostatic)

responses or to toxic effects. Indeed, exposure to a low-level stress can cause an alteration in a molecular, biochemical or cellular parameter without a change in the population due to the acclimatization response of the organism. (Huggett et al. 1992). But an alteration in molecular, biochemical and cellular parameters could be related also to the incapacity of the animal to manage other stressful conditions including the presence of pathogens. Therefore, it should be interesting to couple this type of contamination approach to a pathogen challenge (Gagnaire et al. 2007) in order to evaluate, at the physiological level, the effect of contaminants on immune defences in marine bivalves such as the Pacific cupped oyster *C. gigas*.

Acknowledgments

This study was supported by a PhD grant from the Conseil Général of the Charente-Maritime for A. Luna-Acosta. The Conseil Régional de Poitou-Charentes is acknowledged for financial support through the research project 'POLERON' (Modifications chimiques de polluants organiques dans le bassin de Marennes-Oléron, toxicité des produits de dégradation sur l'huître creuse) and the laboratory IDHESA for diuron and DCPU analysis in water and oyster soft tissues.

References

- Arias M, Arenas M, Rodriguez J, Soliveri J, Ball A, Hernandez M (2003) Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenol substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. Applied and environmental microbiology 69:1953-1958
- ASCI ENCE (2005) Aquatic environment monitoring report, Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS) reports
- Auffret M, Oubella R (1997) Haemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas* : *In vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comparative Biochemistry and Physiology A 118:705-712
- Barbash J (1999) Distribution of major herbicides in ground water of the United States, U.S. Department of the Interior, U.S. Geological Survey, Sacramento, Cali
- Bocquene G, Roig A, Fournier D (1997) Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*): Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. FEBS Letters 407:261-266
- Bodin N, Burgeot T, Stanisière JY, Bocquéné G, Menard D, Minier C, Boutet I, Amat A, Cherel Y, Budzinski H (2004) Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. Comparative Biochemistry and Physiology C 138:411-427
- Bouilly K, Bonnard M, Gagnaire B, Renault T, Lapegue S (2007) Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 52:58-63
- Bouilly K, Gagnaire B, Bonnard M, Thomas-Guyon H, Renault T, Miramand P, Lapègue S (2006) Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquatic Toxicology 78:149-156

- Brethead S, Toutant JP, Saglio P (2000) Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47:117-124
- Buisson S, Bouchart V, Guerlet E, Malas J, Costil K (2008) Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in shellfish production area in Normandy (France). *Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes* 43:655-664
- Burgoa B, Wauchope R (1995) Pesticides in run-off and surface waters. In: Roberts T, Kearney P (eds) *Environmental behaviour of agrochemicals*. John Wiley and Sons NY, p 418
- Cheney D, MacDonald B, Elston R (2000) Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington. *Journal of Shellfish Research* 19:353-359
- Dittmer N, Suderman R, Jiang H, Zhu Y, Gorman M, Kramer K, Kanost M (2004) Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:29-41
- Dodge A (1989) Herbicides interacting with photosystem II. In: *Herbicides and plant metabolism*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p 277
- Ericson H, Thorsen G, Kumblad L (2010) Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquatic Toxicology* 99:223-231
- European Commission (2000) EU Water Framework Directive. Commission European
- FAO (2010) Aquaculture Production: Quantities 1950-2008. Fishstat Plus
- Fenoll L, Rodriguez-Lopez J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, Tudela J (2002) Unification for the expression of the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 54:137-141
- Gagnaire B (2005) Etude des effets des polluants sur les paramètres hématologiques de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Université de La Rochelle
- Gagnaire B, Gay M, Huvet A, Daniel J, Saulnier D, Renault T (2007) Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *In vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* 84:92-102
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeot T, Renault T (2006) Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology* 22:1-14
- Gagne F, Blaise C, Andre C, Salazar M (2006) Effects of pharmaceutical products and municipal wastewaters on temperature-dependent mitochondrial electron transport activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 143:388-393
- Gagne F, Blaise C, Hellou J (2004) Endocrine disruption and health effects of caged mussels, *Elliptio complanata*, placed downstream from a primary-treated municipal effluent plume for 1 year. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 138:33-44
- Geoffroy L, Teisseire H, Couderchet M, Vernet G (2002) Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72:178-185
- Gerecke A, Schärer M, Singer H, Müller S, Schwarzenbach R, Sägesser M, Ochsenbein U, Popow G (2002) Sources of pesticides in surface waters in Switzerland: Pesticide load through waste water treatment plants - current situation and reduction potential. *Chemosphere* 48:307-315

- Giacomazzi S, Cochet N (2004) Environmental impact of diuron transformation: A review. *Chemosphere* 56:1021-1032
- Gramatica P, Di Guardo A (2002) Screening of pesticides for environmental partitioning tendency. *Chemosphere* 47:947-956
- Heberer T (2002) Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology Letters* 131:5-17
- Hellio C, Bado-Nilles A, Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H (2007) Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol* 22:433-440
- Huggett R, Kimerle R, Mehrle Jr. P (1992) Biomarkers: biochemical, physiological and histological makers of anthropogenic stress, Vol. Lewis, Boca Raton
- Hyne RV, Aistroppe M (2008) Calibration and field application of a solvent-based cellulose membrane passive sampling device for the monitoring of polar herbicides. *Chemosphere* 71:611-620
- Johnston SA (1981) Estuarine dredge and fill activities: A review of impacts. *Environmental Management* 5:427-440
- Luna-Acosta A, Rosenfeld E, Amari M, Fruitier-Arnaudin I, Bustamante P, Thomas-Guyon H (2010) First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology* 28:719-726
- Mah SA, Moy GW, Swanson WJ, Vacquier VD (2004) A perforin-like protein from a marine mollusk. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316:468-475
- Mitta G, Galinier R, Tisseyre P, Allienne JF, Girerd-Chambaz Y, Guillou F, Bouchut A, Coustau C (2005) Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 29:393-407
- Munaron D (2004) Study of herbicides and nutrients inputs by the Charente river to the coast and modelling of the dispersion of atrazine in the Marennes-Oléron bay. Université Pierre et Marie Curie Paris V
- Munaron D, Dubernet J, Delmas F, Stanisiere J, Scribe P (2006) Assessment of the quantities of herbicides and nutrients brought down by the river Charente to the coast and modelling of the dispersion of atrazine in the Marennes-Oleron bay. *Cahiers de Biologie Marine (Station Biologique de Roscoff)* 47:85-92
- Muñoz I, López-Doval J, Ricart M, Villagrasa M, Brix R, Geiszinger A, Ginebreda A, Guasch H, López de Alda M, Romani A, Sabater S, Barceló D (2009) Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat river basin (Northeast Spain). *Environmental Toxicology and Chemistry* 28:2706-2714
- Perdue J, Beattie J, Chew K (1981) Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *Journal of Shellfish Research* 1:9-16
- Pesce S, Margoum C, Montuelle B (2010) *In situ* relationship between spatio-temporal variations in diuron concentrations and phototrophic biofilm tolerance in a contaminated river. *Water Research* 44:1941-1949
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:e45
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30:e36

- Pomati F, Netting AG, Calamari D, Neilan BA (2004) Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis sp.* and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology* 67:387-396
- Pomerantz S (1963) Separation, purification, and properties of two tyrosinases from hamster melanoma. *The Journal of Biological Chemistry* 238:2351-2357
- Rao P, Knaus EE (2008) Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 11:81-110
- Renault T, Le Deuff R, Cochenec N, Maffart P (1994) Herpes viruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France - Comparative study. *Revue Médicale Vétérinaire* 145:735-742
- Saglio P, Trijasse S (1998) Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35:484-491
- Samain J, Degremont L, Soletchnik P, Haure J, Bedier E, Ropert M, Moal J, Huvet A, Bacca H, Van Wormhoudt A, Delaporte M, K, Pouvreau S, Lambert C, Boulo V, Soudant P, Nicolas J, Le Roux F, Renault T, Gagnaire B, Geret F, Boutet I, Bourgeot T, Boudry P (2007) Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268:227-243
- Shankar MV, Néliu S, Kerhoas L, Einhorn J (2008) Natural sunlight -induced photo-degradation of phenylurea herbicides in water. *Chemosphere* 71:1461-1468
- Smith P, Khron R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provanzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B, Goeke N, Olson B, Klenk D (1985) Measurement of a protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150:76-85
- Söderhäll K, Cerenius L (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10:23-28
- Soletchnik P, Lambert C, Costil K (2005) Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *Journal of Shellfish Research* 24:197-207
- Soletchnik P, Ropert M, Huvet A, Moal J, Degremont L, Bedier E, Bouget J, Dubois B, Martin J, Enriquez Diaz M, Faury N, Le Moine I, Renault T, Gagnaire B, Samain J (2003) Characterization of summer mortalities of *C. gigas* oyster in France in relation to environmental parameters. *Journal of Shellfish Research*
- Tanguy A, Boutet I, Laroche J, Moraga D (2005) Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS Journal* 272:390-403
- Therond P, Gerbaud P, Dimon S, Anderson WB, Evain-Brion D, Raynaud F (1996) Antioxidant enzymes in psoriatic fibroblasts and erythrocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 106:1325-1331
- Thomas K, Fileman T, Readman J, Waldock M (2001) Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological effects. *Marine Pollution Bulletin* 42:677-688
- Togola A, Budzinski H (2008) Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A* 1177:150-158
- Wiens M, Korzhev M, Krasko A, Thakur N, Perovic-Ottstadt S, Breter H, Ushijima H, Diehl-Seifert B, Müller I, Müller W (2005) Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against bacteria involves a MyD88-dependent signaling pathway. Induction of a perforin-like molecule. *The Journal of Biological Chemistry* 280:27949-27959

Zar J (1984) Biostatistical analysis, Vol. Prentice-Hall, New Jersey

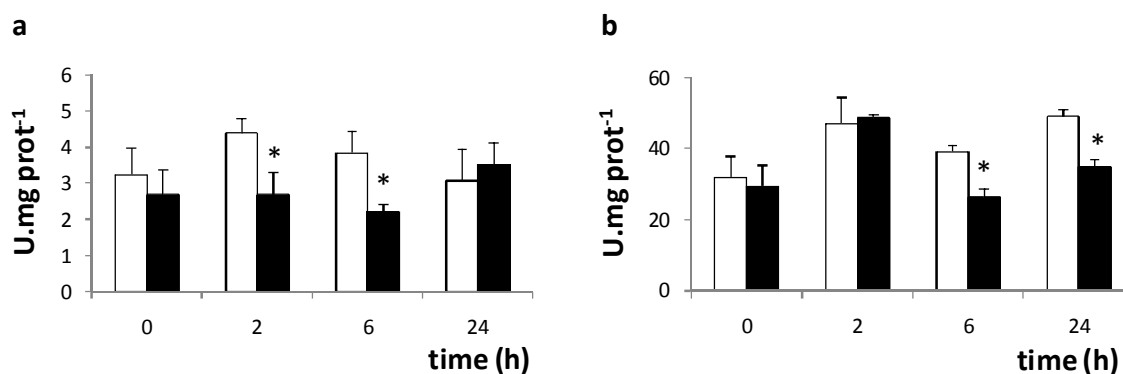


Figure 1 Effect of diuron ($1 \mu\text{g.l}^{-1}$) on enzymatic activities in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. a. laccase and b. superoxide dismutase activities. White bars correspond to the control and black bars correspond to the treatment condition. Mean \pm SD U mg prot⁻¹, n= 6 (3 replicates of 2 pools of 20 oysters), N= 2 experiment replicates * statistical difference between control and treatment at each time with $p < 0.05$.

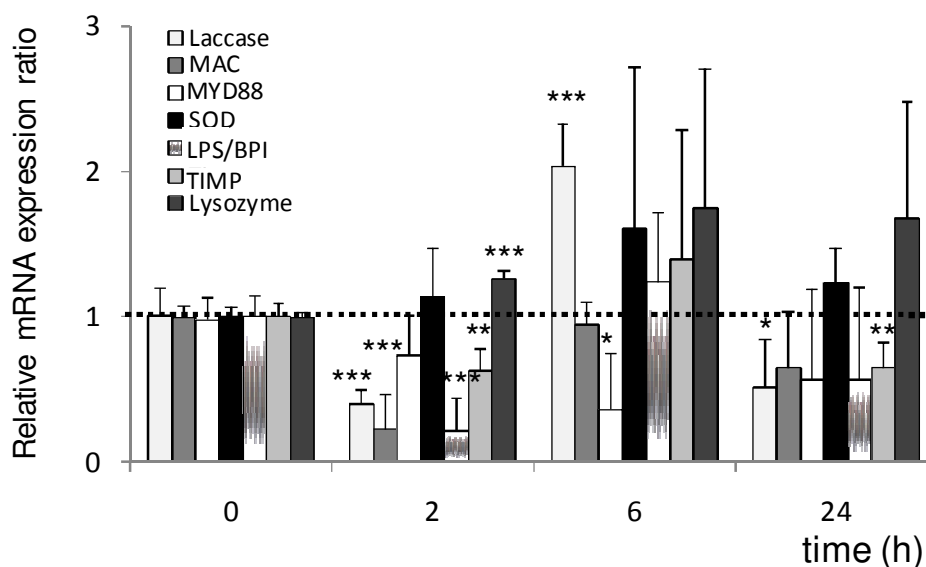


Figure 2 Effect of diuron ($1 \mu\text{g.l}^{-1}$) on gene expression in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Results are expressed as relative expression to the control of each time. Control values were represented by the dotted line located at 1 relative expression of transcripts. Mean \pm SD U relative mRNA expression ratio, n= 6 (3 replicates of 2 pools of 20 oysters), N= 2 experiment replicates. MAC: macrophage expressed protein 1-like; MyD88: myeloid differentiation factor; SOD: superoxide dismutase; LBP/BPI: lipopolysaccharide-binding protein (LBP)/mammalian bactericidal/permeability-increasing protein; TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinases. ** statistical difference between control and treatment at each time with $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

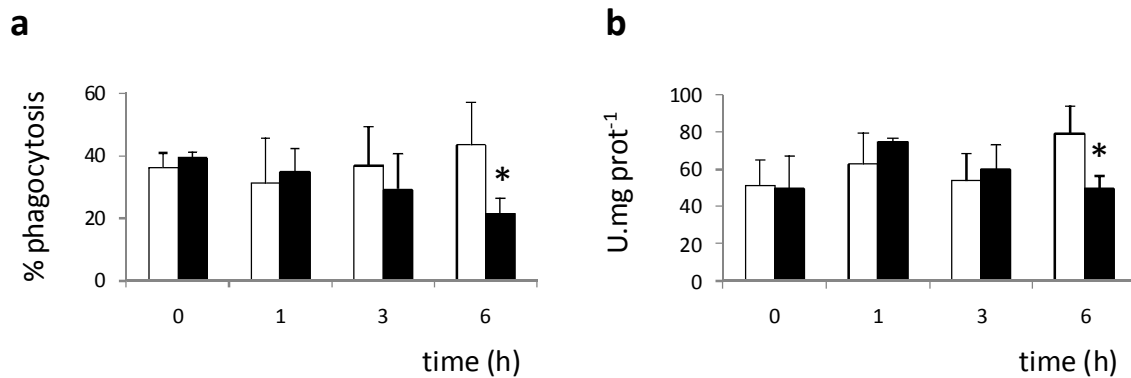


Figure 3 Effect of a mixture of herbicides (diuron at 5 $\mu\text{g.l}^{-1}$, isoproturon at 5 $\mu\text{g.l}^{-1}$) and pharmaceuticals (ibuprofen at 5 $\mu\text{g.l}^{-1}$) on (a) phagocytosis (in %) in the haemolymph and (b) phenoloxidase-type catecholase activity (in U.mg prot^{-1}) in the plasma of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. White bars correspond to the control and black bars correspond to the treatment condition. Mean \pm SD % or U mg prot^{-1} , $n= 12$ (4 replicates of 3 pools of 20 oysters), $N= 4$ experiment replicates * statistical difference between control and treatment at each time with $p<0.05$. n.a.: not available.

Table 1 Physico-chemical characteristics of diuron, isoproturon and ibuprofen. N: dangerous to the environment; Xn: harmful; M: molecular weight; Kow: octanol/water partition coefficient; Koc: organic carbon/water partition coefficient.

Product	Molecular formula	Hazard codes	M (g.mol ⁻¹)	Solubility (mg.l ⁻¹)	Log K _{ow}	K _{oc} (L.kg ⁻¹)
Diuron	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	N, Xn	233.1	42 (at 25°C)	2.8 (at 25°C)	355
Isoproturon	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O	N, Xn	206.3	70.2 (at 25°C)	2.5 (at 25°C)	42
Ibuprofen	C ₁₃ H ₈ O ₂	Xn	206.3	0.043 (at 37°C)	4.50 (at 25°C)	302

Table 2 Immune-related genes and reference gene selected for real-time PCR analysis and selected primer sequences. MAC: macrophage expressed protein 1-like; MyD88: myeloid differentiation factor; SOD: superoxide dismutase; LBP/BPI: lipopolysaccharide-binding protein (LBP)/mammalian bactericidal/permeability-increasing protein; TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinases; EF I: elongation factor I.

Genes	Functions	5'-3'primer sequence		GenBank n°	Reference
		Forward	Reverse		
Laccase	Humoral defences	Forward	tgg ttc ctg cat tgt cac at	EU678320	Faury et al., pers. com.
		Reverse	aag agt atc agc cgc gaa aa		
MAC	Phagocytosis	Forward	acc gag acc gag ttt cag ggg gta g	EF627979	Bado-Nilles et al., 2009
		Reverse	gcc acc gaa agc cgg aga aga tgt c		
MyD88	Cell signaling	Forward	cgt gcc atg gac gga taa caa cg	DQ530619	Bado-Nilles et al., 2009
		Reverse	ggc cca gca gta cct ctg tgg aat c		
SOD	Antioxidant defences	Forward	atc tga ccg gtt tca acg tc	BQ426796	Faury et al., pers. com.
		Reverse	gcc aat cga aag tcc tgg ta		
LBP/BPI	Cell signaling and PO activation	Forward	tga cgt cag ccc aat gta ag	AY165040	De Decker et al., pers. com.
		Reverse	act gct ggg ctt tgt gaa ct		
TIMP	Protease inhibition	Forward	agt cat tga atc cgg acc ag	BQ427105	Faury et al., pers. com.
		Reverse	aac ccc tcc ttc cct ctg ta		
Lysozyme	Bactericidal effect	Forward	gcg gct act tcc aaa tca ag	AB179775	Faury et al., pers. com.
		Reverse	tca cag ttt gct gga caa cc		
EF I	Translational elongation (Reference gene)	Forward	agt cac caa ggc ggc tgc aca gaa	BQ426516	Montagnani et al., 2007
		Reverse	tcc gac gta ttt ctt tgc gat gt		

Table 3 Diuron content in seawater and oysters in the experiment with diuron (at 1 µg.l⁻¹).
 NA: not available.

Sample	Parameter	Time (h)		
		0	2	24
Seawater	Diuron concentration (µg.l ⁻¹)	0.821	NA	0.647
	Quantity of diuron per tank (µg)	41	NA	32
Oyster	Diuron concentration (µg.kg ⁻¹)	<0.2	9.200	10.800
	DCPU concentration (µg.kg ⁻¹)	<0.2	<0.2	<0.2
	Quantity of diuron per oyster (µg)	<0.2	0.014	0.016
	BCF (L.kg ⁻¹) *	NA	NA	16.7
	Theoretical FR (L.oyster ⁻¹ .h ⁻¹) †	1.7		

*BCF: The bioconcentration factor corresponds to the ratio of oyster diuron concentration / seawater diuron concentration.

† Theoretical FR: The theoretical filtration rate was calculated with the formula of Powell et al (1992): $FR = (SL^{0.96} \times T^{0.95}) / 2.95$, where FR is the filtration rate (ml filtered per oyster and per min), SL (in cm) is shell length and T is temperature (in °C). Then our result was expressed in l filtered per oyster and per hour.

Annexe 6 : Use of chemical dispersant in coastal and estuarine areas: potential immunotoxic effects of chemically dispersed oil in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, juveniles

Use of chemical dispersant in coastal and estuarine areas: potential immunotoxic effects of chemically dispersed oil in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, juveniles

Luna-Acosta, A.^{a,*}, Kanan, R.^b, LeFloch, S.^b, Huet, V.^a, Pineau P.^a, Bustamante, P.^a, Thomas-Guyon, H.^{a,*}

^a Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

^b Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentation sur les Pollutions Accidentelles des Eaux (CEDRE), 715 Rue Alain-Colas, CS41836-F-29218 Brest Cedex 2, France

* Corresponding authors: H. Thomas-Guyon and A. Luna-Acosta

Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs),
UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle,
2 rue Olympe de Gouges
F-17042 La Rochelle Cedex 01, France
Email: hthomas@univ-lr.fr / aluna1508@yahoo.com
Tel: +33 (0)5 46 50 76 23
Fax: +33 (0)5 46 50 76 63

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of chemically dispersed oil on an economically and ecologically important species inhabiting coasts and estuaries, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Studies were carried out with juveniles, known to be generally more sensitive to environmental stress than adults. Different enzyme activities implicated in defence mechanisms, i.e. superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), catecholase-type phenoloxidase (PO), laccase-type PO and lysozyme were analyzed in different oyster tissues, i.e. the gills, the digestive gland, the mantle and in different hemolymphatic compartments, i.e. the plasma and the haemocyte lysate supernatant (HLS). Results indicated that total PAHs body burdens were 2.7 times higher in the presence than in the absence of the chemical dispersant (D). Moreover, in the presence of D, alkylated naphthalenes accounted for 55% of the total PAHs body burden, while in the absence of D, alkylated fluorenes and alkylated dibenzothiophenes accounted for 80%. Following exposure to PAHs, in the presence or in the absence of D, enzyme activities were generally inhibited in the gills and in the plasma, while enzyme activities were generally activated in the mantle and in the haemocytes. These results suggest that the gills and the plasma constitute sensitive compartments in *C. gigas*, and that the mantle and the haemocytes might play an important role in protection against xenobiotics. It is important to notice that when oil was chemically dispersed with D, these results were accentuated raising questions about the potential immunotoxic effects of using dispersants in accidental oil spills in nearshore areas for this estuarine species.

Key words: chemical dispersion, oil spill, bivalve, defence mechanisms, tissue-dependent response

1. Introduction

The biological and economical consequences of numerous accidental oil spills that have occurred during the last 40 years are concrete proofs of the necessity for developing reliable oil spill countermeasures. Unfortunately, the use of inappropriate pollution control measures, e.g. physical oil removal or bioremediation, in special areas such as estuaries and closed bays, can cause additional harm to oil-impacted zones (Marchand 1998). Among oil spill cleanup techniques, chemical dispersants are complex mixtures, primarily containing surfactants and solvents, which reduce the interfacial tension at the oil-water interface and therefore, facilitate the downward mixing of oil into the water (Canevari 1973, Canevari 1978, Li & Garrett 1998). In that way, oil can be dispersed to concentrations below toxicity threshold limits (Lessard & DeMarco 2000, Page et al. 2000), become more accessible to hydrocarbon-degrading bacteria (Venosa & Zhu 2003), and have lesser impact on shorelines. Moreover, third generation dispersants are considered as non toxic and biodegradable. However, because of the higher exposure of organisms to petroleum compounds that may be triggered by the use of chemical dispersants in zones with low water-column depth, e.g. coasts and estuaries, most countries that allow the use of dispersants have rigid rules: minimum water depth (normally 20 m), minimum current speed (normally 1 meter per second), and minimum distance from the shore or in front of offshore islands (normally 2 km) (Ramachandran et al. 2004). Recently, a Net Environmental Benefit Analysis (NEBA) carried out by Baca *et al.* 2006) on a 20 years field study, revealed no long-term environmental impact of dispersed oil in nearshore tropical areas. Therefore, the use of dispersants in other nearshore zones in response to accidental oil spills where human activities are highly concentrated, such as the Transocean Deepwater Horizon oil rig explosion, should be taken into consideration.

Coasts and estuaries are considered as sensitive areas since they provide habitats for a large number of organisms, constitute nursery grounds for juveniles of several commercially important species, and support very high productivity. Sessile and filter-feeder organisms inhabiting these zones, such as the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1753), are constantly in contact with various chemical molecules. Environmental stress from pollutants seems to be an important determining factor to weaken defence mechanisms in these organisms and therefore to enhance the occurrence or the increase of diseases, and more particularly in young life stages, i.e. larvae and juveniles (Perdue *et al.* 1981, Lacoste *et al.* 2001). Among immune defence mechanisms in bivalves, antioxidant enzyme activities, e.g. superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and enzyme activities implicated in humoral innate defences, e.g. lysozyme and phenoloxidase (PO), have shown to be modulated by the presence of several types of pollutants (Cheung *et al.* 2004, Verlecar *et al.* 2007, Bado-Nilles *et al.* 2008a, b, Stabili & Pagliara 2009, Bado-Nilles *et al.* 2010). In this respect, these responses have shown to be tissue-dependent (Cheung *et al.* 2001, Cheung *et al.* 2002, Cheung *et al.* 2004, Luna-Acosta *et al.* 2010a).

POs are the key enzymes of melanization and are known to be implicated on invertebrate immune responses (Söderhäll & Cerenius 1998). This group of enzymes is composed of tyrosinases, catecholases and laccases and recently, the presence of catecholase and laccase activities in *C. gigas* were demonstrated (Hellio *et al.* 2007, Luna-Acosta *et al.* 2010b).

In this general context, the aim of this study was to evaluate experimentally the effects of chemically-dispersed oil in defence mechanisms, i.e. superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), catecholase-type phenoloxidase (PO), laccase-type PO and lysozyme activities of Pacific oyster *C. gigas* spats, on different tissues, i.e. gills, digestive gland, mantle, and haemolymphatic compartments, i.e. haemocytes and plasma (acellular fraction of the haemolymph). To this end, comparisons between oysters exposed to chemically dispersed oil, to non dispersed chemical dispersion (CD), mechanical dispersion, (MD), water soluble fraction (WSF) and dispersant (D).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Oil • An Arabian Light crude oil, the Brut Arabian Light 110 (BAL 110), was used for this study. The crude oil was topped at 110°C to remove the most volatile components, in order to simulate the natural behaviour of the oil after it is released at sea (evaporation of most volatile components) and before it reaches coastal zones. BAL 110 possesses the following physico-chemical characteristics, similar to oil spilled by the Amoco Cadiz in 1978: 0.860 of density at 20°C, 60 mPa s of viscosity at 15°C, 12% polar compounds, 34% aromatic hydrocarbons and 54% saturated hydrocarbons.

Dispersant • The chemical dispersant used in this study was selected following an evaluation carried out by the Centre of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution (CEDRE), which defines it as (1) effective to be used in the marine environment, (2) non-toxic at the concentration recommended by the manufacturer (i.e. Total Fluides) and (3) biodegradable. Its physico-chemical characteristics were not available for reasons of confidentiality.

2.2. Biological material

Pacific oyster *Crassostrea gigas* juveniles (3-4 cm in height, less than 1 year old) were purchased from the hatchery France Naissain, located at Bouin (France). Oysters were acclimatised in the laboratory at 15 ± 1°C during two weeks before starting the experiments. Animals were fed daily with *Heteroskeletonema* sp. (Bacillariophyceae).

2.3. Experimental design

The experiment, consisting on an exposure period followed by a depuration period, was carried out three times to have a replication of analysis.

Experimental system • The experimental system consisted of a 300 L static water tanks (Figure 1). Because of the hydrophobic character of the oil, a funnel (at the surface of each

tank) was connected to a submersed Johnson L450 water pump (at the bottom of the tank), in order to maintain the mixture of oil and dispersant as a homogenous solution. Preliminary tests have confirmed that total petroleum hydrocarbon concentrations in the water column were depth-independent, suggesting that small petroleum droplets were homogeneously dispersed into the water column (data not shown). The oxygen saturation of water in each tank was maintained at around 96% by a compressor that injected air via an air stone. The experimental system was placed in a thermoregulated greenhouse, in order to maintain the temperature of the exposure studies at 15 ± 1 °C.

Exposure • One experimental system per condition was used, making a total of five experimental systems. Thirty oysters were transferred to each experimental system and the different exposure conditions are summarized in Table 1. The exposure period lasted 2 days. Seawater used for this study (pH: 7.95 ± 0.05 , salinity: 35.2 ± 0.1 p.s.u.) was provided by Oceanopolis, Brest (France). This seawater was treated by UV-light and filtrated at $0.45 \mu\text{m}$ before use. In the first tank, the control exposure condition was made with clean seawater. In the second tank, the chemical dispersion (CD) condition was made by pouring 66g of BAL 110 and 4g of dispersant into the funnel of the experimental system. In the third tank, the mechanical dispersion (MD) condition was made by pouring 66g of BAL 110 into the funnel. In the fourth tank, an internal control for CD was made by pouring 4 g of chemical dispersant into the funnel. In the fifth tank, an internal control for MD was made with a water-soluble fraction (WSF) of BAL 110. To obtain the WSF, a plastic circle placed on the surface of the seawater in the experimental system. Then, BAL 110 (66 g) was placed within the plastic circle, in order to contain the oil slick at the surface and without mixing. In that way, oysters were only exposed to the soluble fraction of the oil. All exposure media were added to the tanks 12h before adding oysters, time necessary to obtain a relatively stable oil concentration in the water column.

Depuration • Fifteen oysters per treatment condition were placed in a decontamination tank, located in the thermoregulated greenhouse ($T = 15 \pm 1$ °C) and containing fresh water, for a recovery period of 15 days. Oysters were fed daily with an algal diet (5.10^4 cell.ml⁻¹) composed of *Heteroskeletonema* sp (Bacillariophyceae).

2.4. Sample procedure

Pooled gills, digestive glands, mantles, haemocyte fraction and plasma of ten oysters were used for each replicate sample, and three replicates were prepared per treatment. After opening the oyster shells by cutting off the adductor muscle, approx. 0.3 to 0.5 ml of haemolymph was withdrawn and centrifuged at $260 \times g$ for 10 min at 4°C in order to separate the cellular (haemocytes) fraction from the plasma. Gills, digestive gland and mantle were removed from the soft tissues then homogenized at 4°C in 0.1 M Tris HCl buffer pH 7.0 (0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂; 0.5 ml of buffer.g⁻¹ of fresh weight for the gills and the mantle, and 1 ml.g⁻¹ of fresh weight for the digestive gland), using an Ultra Turrax (T25 basic, IKA-WERKE) and a Thomas-Potter homogenizer (IKA-Labortechnik RW

20.n, size 0.13-0.18 mm, BB). The homogenates were centrifuged at 10 000 x g for 10 min at 4°C. The resulting supernatant was collected for enzymatic studies.

2.5. Biochemical analysis

Superoxide dismutase assay • SOD was determined by an indirect method (Therond et al. 1996), based on competition of SOD with iodinitrotetrazolium (INT) for dismutation of superoxide anion (O_2^-). In the presence of O_2^- , INT is reduced into a red formazan dye that can be measured at 505 nm at 25°C (Kit Ransod SD 125, Randox, France). One unit of SOD is defined as the amount of enzyme that promotes a 50% decrease in the rate of INT reduction.

Glutathione peroxidase assay • GPx activity was determined according to the method of Paglia and Valentine (1967). In the presence of glutathione reductase and substrates (i.e. reduced glutathione and cumene hydroperoxide), the decrease of absorbance at 340 nm is proportional to the reduction of the oxidised glutathione by NADPH, H^+ (Kit Ransel RS 504, Randox, France). One unit of GPx oxidises 1 μ mol of NADPH ($\epsilon_{NADPH} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) per minute.

Catalase assay • Catalase activity was determined according to the method of Fossati et al. (1980). This method is based on the measurement of the hydrogen peroxide substrate remaining after the action of catalase. First, catalase converts hydrogen peroxide to water and oxygen and then this enzymatic reaction is stopped with sodium azide. An aliquot of the reaction mix is then assayed for the amount of hydrogen peroxide remaining by a colorimetric method (Kit Catalase CAT-100, Sigma).

Catecholase-type and laccase-type phenoloxidase assay • Catecholase-type phenoloxidase (PO) and laccase-type PO activities were determined according to the method of Asokan et al. (1997), with slight modifications (Luna-Acosta *et al.* 2010b). Catecholase-type PO activity assay was carried out in triplicate for each sample in the presence of 100 mM dopamine and 0.1 M Tris HCl buffer, pH 7.0 (0.45 M NaCl, 26 mM $MgCl_2$, 10 mM $CaCl_2$; Sigma-Aldrich, France). Catecholase-type PO activity was followed by monitoring the increase of absorbance at 490 nm for 4 h. Laccase-type PO activity assay was carried out in triplicate for each sample in the presence of 50 mM PPD, diluted in methanol, and 0.1 M Tris HCl buffer, pH 7.0 (0.45 M NaCl, 26 mM $MgCl_2$, 10 mM $CaCl_2$; Sigma-Aldrich, France). Laccase-type PO activity was followed by monitoring the increase of absorbance at 420 nm for 2 h. Nonenzymatic oxidation by the substrate was followed in wells without oyster sample and subtracted to oxidation of the substrate with oyster sample. One unit of catecholase-type PO and one unit of laccase-type PO specific activities correspond to the amount of enzyme that catalyzes the production of 1 μ mole of product ($\epsilon=3,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and $43,160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectively), per minute and per milligram of protein (Pomerantz 1963, Fenoll *et al.* 2002).

Lysozyme assay • Lysozyme assay was done in triplicate for each sample and compared against hen egg white lysozyme standards (2.5-20 $\mu\text{g ml}^{-1}$), in the presence of *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, France). One unit of lysozyme corresponds to the amount of enzyme that diminishes absorbance at 450 nm of 0.001 per minute at pH 7.0, at 25°C (Soudant et al. 2004).

Protein assay • All activities were expressed in relation to protein concentration measured according to the Lowry method with slight modifications, by using bicinchoninic acid and copper sulphate 4% (Smith *et al.* 1985). Serum albumin was used as protein standard (Sigma-Aldrich, France).

2.6. Chemical analysis in oysters

The levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oysters were determined with a Varian Saturn 2100 T GC–MS device, using the procedure of Baumard *et al.* 1997 with some modifications. Three pools of five oysters were analyzed per treatment. Prior to extraction, each oyster sample was homogenized using an Ultra Turrax (Janke and Kunkel, IKA®-Labortechnik). One hundred and 50 µl of perdeuterated internal standards (CUS-7249, Ultra Scientific, Analytical solutions) were added to 3 g of homogenized oyster samples and the obtained mixtures were digested for 4 h under reflux in 50 ml of an ethanolic solution of potassium hydroxide (2 M, Fisher Chemicals). After cooling, settling and addition of 20ml of demineralised water, the digest was extracted in a 250 ml funnel two times with 20 ml of pentane (Carlo Erba Reactifs, SDS). The extract was evaporated with a Turbo Vap 500 concentrator (Zyman, Hopkinton, MA, USA, at 880 mbar and 50 °C) to obtain 1 ml of concentrated extract. The purification of the extract was performed by transfer to a silica column (5g of silica). Hydrocarbons were eluted with 50 ml of pentane: dichloromethane (80 : 20, v:v, SDS) and concentrated to 200 µl by means of a TurboVap 500 concentrator (Zyman, 880 mbar, 50°C). Aromatic compounds were analysed by GC–MS, with a detection limit of 5 µg.kg⁻¹ of dry weight, and PAHs were quantified relative to the perdeuterated internal standards introduced at the beginning of the sample preparation procedure.

2.7. Statistical analysis

All values are reported as mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was carried out with STATISTICA 7.0. Values were tested for normality (Shapiro test) and homogeneity of variances (Bartlett test). In some cases, logarithmic transformations (Log₁₀) were used to meet the underlying assumptions of normality and homogeneity of variances. Two-way nested ANOVA were used to analyze results, with treatment and period as fixed factors, and pool as random factor. The period factor corresponds to the exposure period and the depuration period. Pool was nested within each combination of treatment and time (Zar, 1984). When the null hypothesis (H₀: no difference between treatments or within treatment at different time intervals) was rejected, significant differences were tested using Tukey's HSD test. For non normal values, i.e. to compare oyster PAHs content between different treatments, a Kruskal-Wallis test was used, followed by a Dunn's multiple comparisons test. Spearman's rank correlation analysis was used to test whether the levels of enzyme responses were related to PAH concentrations in oyster tissues. Statistical significance was designed as being at the level of $p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$.

3. Results

3.1. Chemical analyses

After 2 days of exposure, PAHs were efficiently bioaccumulated in *C. gigas*. When exposed to chemically dispersed oil (CD) or to oil without chemical dispersant (MD), significant differences with the control condition were found ($F_{4,15} = 12.83$, $p = 0.01$, Table 2). Nevertheless, the total PAHs content in oysters of the CD condition was almost 3 times higher than in the MD condition. After 15 days of depuration PAH content in oysters decreased by 97 and 93% in CD and MD conditions but results were found to be significantly higher to the control condition ($F_{4,15} = 10.27$, $p = 0.03$, Table 2). Independently of time and treatment, light PAHs (≤ 3 rings), and its alkylated homologues, accounted for at least 90% of the total PAHs in oyster tissues (Fig. 1). After 48h of exposure, alkylated naphthalene (NaF), alkylated dibenzothiophene (DBT) and alkylated fluorene (Fl) accounted for a large proportion of the PAH content in oyster tissues of the CD condition, i.e. 55 ± 6 , 19 ± 1 , $18 \pm 8\%$, respectively (Fig. 1). In the MD condition, alkylated DBT and alkylated Fl accounted for a large proportion of the PAH content in oyster tissues, i.e. $38 \pm 2\%$ and 40 ± 2 , respectively. Alkylated DBT ($22 \pm 0.1\%$) and alkylated Fl ($53 \pm 0.1\%$) also accounted for a large proportion of the PAH content in oyster tissues of the WSF condition. For the D condition, alkylated DBT ($45 \pm 6\%$) and anthracene ($30 \pm 7\%$) accounted for a large proportion of PAH content in oyster tissues.

After 15 days of depuration, alkylated DBT was shown to be the majoritary PAH compound in oyster tissues of the CD, MD, WSF and D conditions, i.e. $56 \pm 19\%$, $48 \pm 7\%$, $40 \pm 5\%$ and $50 \pm 16\%$, respectively. In the WSF and D conditions, anthracene accounted the largest proportion among PAH compounds in oyster tissues, i.e. 38 ± 5 and $37 \pm 19\%$, respectively (Fig. 1).

3.2. Enzymatic analysis

Overall, no significant differences in enzymatic activities were observed between the control conditions from exposure and depuration periods, independently of the tissue or the haemolymphatic compartment (Fig. 1 to 7). All enzyme activities were affected by both treatment and period, independently of the tissue, except for catecholase and laccase activities in the mantle which were only affected by the treatment (Fig. 5 and 6). No significant effect was observed for treatment, for lysozyme activity in the gills and the plasma (data not shown).

After 2 days of exposure for the CD condition, and relative to the control condition, SOD activities were higher in the plasma (Fig. 1), CAT activities were lower in the gills, the mantle and the plasma (Fig. 2), GPx activities were lower in the gills and in the digestive gland (Fig. 3), catecholase activities were lower in the gills and in the mantle (Fig. 4), laccase activities were lower in the plasma and higher in the gills and the mantle (Fig. 5). For the MD condition, after 2 days of exposure and in comparison to the control condition, SOD activities were higher in the gills and the HLS (Fig. 1), CAT activities were lower in the gills,

the mantle and the plasma (Fig. 2), GPx activities were lower in the digestive gland and the plasma, catecholase activities were lower in the mantle (Fig. 4), GPx activities were and higher in the mantle and the HLS (Fig. 3), catecholase activities were higher in the HLS (Fig. 4), laccase activities were higher in the gills and the HLS (Fig. 5). It is important to notice that the D, which is considered as a non harmful product, also modulated different enzyme activities in *C. gigas*, depending on the analyzed tissue (Fig. 1 to 6).

After 15 days of depuration, some activities returned to control levels, depending on the tissue and on the treatment condition, and in some tissues and for some activities, effects were observed only at this period, e.g. SOD activities in the mantle for the MD condition (Fig. 1), CAT activities in the digestive gland for the CD, WSF and D conditions (Fig. 2), catecholase in the plasma for the CD, MD, WSF and D conditions (Fig. 4) and lysozyme in the mantle for the CD, WSF and D conditions (Fig. 6).

3.3. Correlations between PAH content in oyster tissues and enzyme activities

At the end of the exposure period, significant correlations were observed between different enzyme activities and PAH contents in oyster tissues and responses varied according to the tissue that was analyzed. All results are present in Table 3 but only some of the results will be discussed. Gills SOD activity was positively correlated to the total PAHs oyster content (Σ total PAHs), while gills CAT activity was negatively correlated to Σ total PAHs. In the digestive gland, CAT activity was positively correlated, while GPx was negatively correlated to Σ total PAHs. Haemocyte (HLS) SOD activity was negatively correlated to naphthalene (NaF), while HLS GPx activity was positively correlated to NaF. Moreover, HLS SOD and HLS GPx activities were positively correlated to acenaphthylene (Acny). HLS catecholase activity was positively correlated to \bullet total PAHs. Plasma and HLS laccase activities were negatively correlated to NaF.

4. Discussion

Most oil spills are relatively small ($\sim 1 \text{ m}^3$), occur close to the shore and oil slicks hit shorelines relatively quickly. As a result of the Torrey Canyon incident, where important amounts of toxic dispersants were used and caused severe long-term biological impacts, research effort has been focused on the mechanical clean-up and containment of floating oil. However, this type of techniques can also cause additional harm to oil-impacted zones (Marchand 1998). During the same period, chemical dispersants evolved from products of first generation, effective but very toxic, to products of third generation, with low toxicity and high biodegradability. Unfortunately, little is known about the behavior and effects of dispersed oil in the nearshore environment (ASTM Committee 1984). Thus, the aim of this study was to evaluate the bioaccumulation and effects of chemically dispersed hydrocarbons on a species inhabiting these zones, the Pacific oyster *C. gigas*.

4.1. PAH accumulation and depuration in oyster tissues

The Pacific oyster *C. gigas* is a good indicator of the presence and bioavailability of the oil in the water column and benthic sediments. In this species, bioconcentration factors (BCF) of petroleum hydrocarbons range from 10 to 50 000 (Michel & Henry 1997), so even low levels of exposure are likely to be detectable in oyster tissues. PAHs, with high octanol-water partition coefficients ($\log K_{ow} > 3.5$), are readily taken up by organisms (Meador 2003). Thus, evaluating PAH bioaccumulation is an important part in assessing the risk that chemical dispersants are likely to pose to marine organisms inhabiting coasts and estuaries, especially carcinogenic, mutagenic or teratogenic PAHs. Because no PAHs measurements were carried out in seawater, we were not able to calculate BCF but PAH body burden analysis were conducted. Results showed that, independently of the treatment (i.e. CD, MD, WSF or D), heavy PAHs were poorly accumulated in oyster tissues (0 to 3% of the total PAH content), while light PAHs and mainly their alkylated homologues, which are generally more toxic than the parent compounds, were present in large proportions in all the treatment conditions. Indeed, PAHs with low molecular weight ($\leq 178.2 \text{ g.mol}^{-1}$) such as NaF, DBT and Fl are more likely to be bioaccumulated due to high water solubility and higher bioavailability for organisms (Neff et al. 1976). The present study also revealed that for a same amount of dispersed oil with (CD condition) or without a chemical dispersant (MD condition), and for the same time of exposure, i.e. 2 days, oysters bioaccumulated approximately 2.7 times more PAHs in the presence of the chemical dispersant. In the CD condition, 55% of the total PAH content was composed of high alkylated naphthalene (NaF). This compound was poorly bioaccumulated in the MD and WSF conditions (Figure 1; Table 2), whereas alkylated fluorenes (Fl) and alkylated dibenzothiophenes (DBT) represented between 70 to 80% of the total PAH content (Figure 1; table 2). Results in the CD condition but not in the MD condition are in agreement with a recent study carry out with the scallop *Chlamys islandica* where C3-NaF accounted for a large proportion of the PAHs that were accumulated in the tissues after 15 days of exposure to mechanically dispersed oil (Hannam et al. 2009). In the present study, the exposure experiment was carried out only 2 days, and it cannot be excluded that a longer exposure period might result in a higher alkylated NaF bioaccumulation in oyster tissues. Nonetheless, our results clearly demonstrated that the presence of the chemical dispersant increased the bioaccumulation rate of alkylated NaF in oyster soft tissues.

After 15 days of depuration, more than 90% of the PAHs burden was depurated from oyster's soft tissues. Even if PAH contents in CD and MD conditions was still significantly higher than the control condition, this result clearly shows that oysters can eliminate high quantities of PAHs very rapidly. Interestingly, no differences in PAHs content between CD and MD were found at the depuration period. This result is in agreement with (Gilfillan, 1984). Among PAHs, alkylated DBT were the most persistent PAHs in all treatments (Figure 1; Table 2). This result is in agreement with Berthou et al. (1987) reporting that DBT persist in oyster tissues for at least one year. As in the present study, C3-DBT were among the most persistent PAHs (Berthou et al. 1987), raising questions about their potential toxic effects.

Further studies are therefore needed in order to assess the long-term toxicity of this compound.

4.2. Effect on enzyme activities

The emergence of a disease and the survival of an organism are determined partly by the condition of its immune system. Therefore, measurement of defense mechanisms can provide important early warning signals of the sub-lethal effects of exposure to contaminants and the susceptibility of animals to infectious diseases (Gagnaire et al. 2007, Hannam et al. 2009).

Bivalve molluscs possess two types of innate responses: (1) cellular, i.e. phagocytosis and encapsulation; and (2) humoral, e.g. PO and lysozyme enzyme activities (Tryphonas et al., 2005). During phagocytosis, reactive oxygen species (ROS), such as the superoxide anion radical (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), play an important role in protection against pathogens. However, ROS can also interact with host's biological macromolecules which can result in enzyme inactivation, lipid peroxidation, DNA damage or cell death (Cazenave et al. 2006). The extent to which oxyradical generation produces biological damage depends on the effectiveness of antioxidant defenses, such as SOD, which participates in the transformation of O_2^- into H_2O_2 and H_2O , and of CAT and GPx, which participate in the transformation of H_2O_2 into O_2 and H_2O (Neumann *et al.* 2001).

Environmental contaminants, such as PAHs, can lead to the formation of ROS and enhance oxidative stress in aquatic organisms (Di Giulio *et al.* 1989, Winston 1991). Results in the present study showed a positive correlation between PAH contents and SOD activities. Such relationship has already been reported for different bivalves species exposed to hydrocarbons (Sole *et al.* 1995, Orbea *et al.* 2002, Richardson *et al.* 2008) and suggests that hydrocarbons induced oxidative stress by producing ROS such as O_2^- . However, in the present study CAT and GPx activities were generally negatively correlated to different PAH body burdens. This may be due to the inhibition of enzyme synthesis by PAHs or to enzyme inactivation caused by high tissue contaminant concentrations (Borg & Schaich 1983). Moreover, since GPx and CAT catalyze the transformation of H_2O_2 into H_2O , they may act on common substrates and thus, a competition may exist for the same group of substrates (Kappus 1985). This may explain in the present study the positive correlations of CAT activity and negative correlations of GPx activity with PAH content for a same tissue (Table 3).

Among enzymes implicated in humoral immune defenses in bivalves, POs are the key enzymes of melanization, participating in the entrapment of foreign material in a melanin capsule or to the direct killing of microbes by the toxic quinone intermediates produced during the melanin production cascade (Söderhäll & Cerenius 1998). Tyrosinases, catecholases, and laccases belong to the family of POs. Tyrosinase possess monophenolase (hydroxylation of monophenols) and diphenoloxidase or catecholase (oxidation of diphenols) activities, catecholase possess catecholase activities and laccase (oxidation of p- and m-diphenols and other non phenolic substrates such as diamines) possess both catecholase and laccase activities. In a recent study, no tyrosinase activity (by using different monophenol substrates) was detected in *C. gigas* but catecholase (by using the common substrates of PO,

L-DOPA and dopamine) and laccase (by using the laccase substrate, PPD) activities were detected (Luna-Acosta *et al.* 2010b). In the present study, when using dopamine as substrate for PO assays, catecholase activities were generally inhibited in the presence of hydrocarbons, except for HLS catecholase activity. These results are in agreement with other studies in *C. gigas* where the exposure to hydrocarbons induced an inhibitory effect in PO activities (Bado-Nilles *et al.* 2008a, Bado-Nilles *et al.* 2009). Moreover, in the present study, when using PPD as substrate for PO assays, laccase activities were generally stimulated in the presence of hydrocarbons, except for plasma laccase activity. These results are in agreement with previous studies where the exposure of *C. gigas* to a light cycle oil (LCO) soluble fraction induced an increase in the mRNA expression of laccase gene in the haemocytes after 7 days of exposure (Bado-Nilles *et al.* 2010). Since laccases can catalyze oxidation of aromatics, such as PAHs, by an indirect mechanism involving the participation of an oxidative mediator (Dodor *et al.* 2004), an increase of laccase gene transcription in *C. gigas* may enable a protection against bioaccumulated PAHs, and therefore, laccase could be a potential defense biomarker candidate in ecotoxicological studies.

Lysozyme is one of the most important bacteriolytic agents against several species of Gram-positive and Gram-negative bacteria (Cheng & Rodrick 1974), and has been recorded in various bivalve species (McHenry *et al.* 1986). During phagocytosis, the release of lysosomal enzymes such as lysozymes participates in the inactivation of invading pathogens. Moreover, within bivalve haemocytes, lysosomes sequester, accumulate and metabolize a range of xenobiotics (Hagger *et al.* 2005). However, this detoxification process could be overwhelmed after a threshold exposure (Moore *et al.* 1987). In the present study, an inhibition in lysozyme activity was observed in the digestive gland in the D condition. Previous studies showed an inhibition in lysozyme activity or in lysozyme gene expression in organisms exposed to hydrocarbons (Boutet *et al.* 2004, Gopalakrishnan *et al.* 2009). However, in the present study no inhibition of lysozyme was observed in the presence of hydrocarbons, except in the digestive gland for the D condition. Interestingly, an activation of mantle lysozyme activity was observed during the depuration period, suggesting a potential role of mantle lysozyme activity in detoxification processes.

Uptake of xenobiotics from seawater is generally accomplished by filtration over the gill structure, although diffusion through the integument may also contribute to tissue concentrations (Landrum & Stubblefield 1991). As the organism directs seawater over the gill surface to extract oxygen, hydrophobic contaminants are very efficiently taken up because of the high surface area and lipid-rich membranes. Moreover, bivalves possess an open circulatory system and thus, are continually exposed to fluctuations of environmental factors including contaminants (Cheng 1981). As a general trend, enzyme activities in the plasma and in the gills were generally inhibited, especially in the CD condition (Fig. 1 to 6), suggesting that compartments that are the more exposed to the marine environment, such as the gills and the plasma, are likely to be more affected by the presence of hydrocarbons, in comparison to tissues less exposed to the marine environment, such as the HLS, the mantle and the digestive gland (Cheng 1981, Frouin *et al.* 2007).

Enzyme activities in the mantle and the haemocytes, which are tissue and cells known to play an important role in defense mechanisms in oysters (Cheng 1981, Auffret 2003), were generally activated in comparison to control. Enzyme activities in the digestive gland were less modulated than in the other tissues but enzyme activities were strongly correlated to PAH contents in this tissue, highlighting its role in xenobiotic detoxification (Chafai-El Alaoui 1994, Bustamante 1998, Chu et al. 2003).

4.3. Effect of chemical dispersion (CD) and dispersant (D) conditions

An increase activity of an enzyme implicated in defense mechanisms can be interpreted as a response of the organism to protect itself against a non-self molecule, e.g. xenobiotics. If the activation persists or is too important this can lead to an overstimulation of the immune system, which can be detrimental to the organism. An inhibition of the enzyme activity can be interpreted as a saturation of the system because of the presence of a xenobiotic, an overwhelming of antioxidant enzymes by oxygen radicals, or an immunodeficiency traduced by a direct or an indirect inhibition of mechanisms that modulate this enzyme activity (Huggett et al. 1992, Brousseau et al. 1999). In both cases, changes in defensive enzymes may affect the survival of the organisms when challenged with infectious pathogens (Thiagarajan et al. 2006).

As a general trend, WSF, corresponding to the internal control of MD, modulated less enzyme activities than MD (Table 4). When comparing CD and MD conditions, enzyme activities were generally inhibited in the different analyzed tissues in the CD, but this effect was less observed in the MD condition (Table 4).

Importantly, D also modulated enzyme activities, especially at the end of the depuration period, suggesting that the dispersant alone could provoke long-term effects. Our results are thus in agreement with previous studies that have shown the effects of dispersant on biological functions (Gilfillan et al. 1984). For example, in coral larvae, a third generation dispersant caused larval morphology deformations, loss of normal swimming behavior and rapid tissue degeneration (Shafir et al. 2007).

It is important to notice that transient effects were observed for different enzyme activities and thus longer periods of exposure should be studied. Moreover, not all the enzyme activities returned to control levels after the depuration period and thus, longer depuration periods could give a better insight of long-term effects.

5. Conclusion and perspectives

Results indicated that: (1) responses of enzyme activities implicated in defence mechanisms in juveniles of the Pacific oyster *C. gigas* were highly variable depending on the treatment, the time and the tissue or the haemolymphatic compartment that was studied, highlighting the importance of carrying out studies in different tissues and with multiple enzymes implicated in immune defence mechanisms (2) gill, plasma and HLS lysozyme activities

showed no response to the different treatments; (3) enzyme activities were generally inhibited in the gills and in the plasma, while enzyme activities were generally activated in the mantle and in the haemocytes, suggesting that the gills and the plasma are sensitive compartments in *C. gigas* and that the mantle and the haemocytes play an important role in protection against HAPs and (5) amongst the various parameters, digestive gland CAT activity best correlated with HAP tissue concentrations during the exposure period, while gills SOD activity best correlated with HAP tissue concentrations during both exposure and depuration periods. Gills GPx, plasma CAT and plasma LAC activities best correlated with potential immunodeficiency pollutant effects, i.e. inhibition of enzyme activities, during exposure and depuration periods, and (6) finally, the presence of dispersants or of chemically dispersed oil modulates immune parameters in *C. gigas*, raising questions of the potential immunotoxic effects in accidental oil spills in nearshore areas for this estuarine species. Indeed, in the case of Deepwater Horizon oil spill, for example, a high percentage of oil was dispersed in the water column, with an important number of unknowns on the long term impact of the association oil - dispersant. The results of the present study must, nevertheless, be interpreted with caution, since in the present study, the variance component estimates indicated that the variability attributable to pools was $\leq 30\%$ of the total variability. Thus, we consider necessary to carry out studies with a higher number of oyster pools or with individual analysis to evaluate effects of contaminants at the populational level (Auffret & Oubella 1997). In addition to that, before giving conclusions on the effects of chemical dispersants and of chemically dispersed oil on the whole individual and on oyster populations, to contribute to the establishment of a framework of dispersant use in nearshore areas, other analyses and experiments such as the evaluation of lipid peroxidation levels in oyster tissues (Geret et al. 2002) or the combination of contaminant exposure and pathogen challenges (Hannam et al. 2010) should be taken into consideration.

Acknowledgements

This study was supported by a PhD grant for A. Luna-Acosta from the Conseil Général of the Charente-Maritime. The Programme Ecotechnologies et Développement Durable (PRECODD) of the Agence Nationale de la Recherche (ANR) and especially M. Girin and G. Le Lann are acknowledged for financial support for the project 'DISCOBIOL' (Dispersants et technique de lutte en milieux côtiers : effets biologiques et apports à la réglementation), managed by F. X. Merlin. The authors also acknowledge Total Fluides for providing chemicals. Special thanks go to M. Menguy, M. Pommier for their help and assistance during the study and during the experimental procedures, and to P-G. Sauriau for his help and assistance for statistical analysis.

References

ASTM Committee (1984) Oil spill chemical dispersants: research, experience, and recommendations: a symposium, Vol. ASTM International

- Auffret M (2003) An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs, Editions Quae, Versailles
- Auffret M, Oubella R (1997) Haemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas* : *In vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 118:705-712
- Baca B, Ward G, Lane C, Schuler P (2006) Net environmental benefit analysis (NEBA) of dispersed oil on near shore tropical ecosystem derived from the 20 years 'tropics' field study Proceedings of the International Oil Spill Conference,, London
- Bado-Nilles A, Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Le Floch S, Renault T (2008a) Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicology in Vitro* 22:1610-1617
- Bado-Nilles A, Le Floch S, Renault T, Faury N, Auffret M, Quentel C, Thomas-Guyon H (2008b) Effects of two oils on immune parameters and on the expression of immune related genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* *Physiomar*
- Bado-Nilles A, Quentel C, Auffret M, Le Floch S, Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H (2009) Immune effects of HFO on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:1446-1454
- Bado-Nilles A, Renault T, Faury N, Le Floch S, Quentel C, Auffret M, Thomas-Guyon H (2010) *In vivo* effects of LCO soluble fraction on immune-related functions and gene transcription in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* 97:196-203
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P (1997) Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: application to mussels. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 359:502-509
- Berthou F, Balouët G, Bodennec G, Marchand M (1987) The occurrence of hydrocarbons and histopathological abnormalities in oysters for seven years following the wreck of the Amoco Cadiz in Brittany (France). *Marine Environmental Research* 23:103-133
- Borg D, Schaich K (1983) Cytotoxicity from coupled redox cycling of autoxidizing xenobiotics and metals. *Israel Journal of Chemistry* 24:38-53
- Boutet I, Tanguy A, Moraga D (2004) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329:147-157
- Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Fournier M (1999) Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. *Toxicology* 142:145-156
- Bustamante P (1998) Bioaccumulation et détoxification des éléments traces (métaux lourds et terres rares) chez les mollusques céphalopodes et bivalves pectinidés. Implication de leur biodisponibilité pour le transfert vers les prédateurs, Université de La Rochelle
- Canevari G (1973) Development of the 'next generation' chemical dispersants Prevention and control of oil spills, Washington DC, p 231-240
- Canevari G (1978) Some observations on the mechanism and chemistry aspects of chemical dispersion. *American Society for Testing and Materials* 659:5-17
- Cazenave J, Bistoni M, Zwirnmann E, Wunderlin D, Wiegand C (2006) Attenuating effects of natural organic matter on microcystin toxicity in zebra fish (*Danio rerio*) embryos - benefits and costs of microcystin detoxication. *Environmental Toxicology* 21:22-32
- Chafai-El Alaoui S (1994) Etude de quelques aspects de la contamination métallique chez certains mollusques et poissons marins: Etude environnementale (côte atlantique marocaine) et approche expérimentale. Cadi Ayyad
- Cheng T (1981) Invertebrate blood cells Vol. Academic Press, London,

- Cheng T, Rodrick J (1974) Identification and characterization of lysozyme from the hemolymph of the soft-shelled clam *Mya arenaria*. *Biological Bulletin* 147:311-320
- Cheung CCC, Siu WHL, Richardson BJ, De Luca-Abbott SB, Lam PKS (2004) Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Environmental Pollution* 128:393-403
- Cheung CCC, Zheng GJ, Lam PKS, Richardson BJ (2002) Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin* 45:181-191
- Cheung CCC, Zheng GJ, Li AMY, Richardson BJ, Lam PKS (2001) Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology* 52:189-203
- Chu F, Soudant P, Hale R (2003) Relationship between PCB accumulation and reproductive output in conditioned oysters *Crassostrea virginica* fed a contaminated algal diet. *Aquatic Toxicology* 65:293-307
- Di Giulio RT, Washburn PC, Wenning RJ, Winston GW, Jewell CS (1989) Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8:1103-1123
- Dodor DE, Hwang H-M, Ekunwe SIN (2004) Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 35:210-217
- Fenoll L, Rodriguez-Lopez J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, Tudela J (2002) Unification for the expression of the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 54:137-141
- Frouin H, Pellerin J, Fournier M, Pelletier E, Richard P, Pichaud N, Rouleau C, Garnerot F (2007) Physiological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on soft-shell clam *Mya arenaria*. *Aquatic Toxicology* 82:120-134
- Gagnaire B, Gay M, Huvet A, Daniel J, Saulnier D, Renault T (2007) Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *In vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* 84:92-102
- Geret F, Jouan A, Turpin V, Bebianno M, Cosson R (2002) Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat Living Resour* 15:61-66
- Gilfillan E, Page D, Hanson S, Foster J, Hotham J, Vallas D, Gerber R (1984) Effects of test spills of chemically dispersed and nondispersed oil on the activity of aspartate amino-transferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in two intertidal bivalves, *Mya arenaria* and *Mytilus edulis*. In: ASTM International (ed) Oil spill chemical dispersants: research, experience, and recommendations: a symposium, p 299-313
- Gopalakrishnan S, Thilagam H, Huang W-B, Wang K-J (2009) Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo(a)pyrene. *Chemosphere* 75:389-397
- Hagger JA, Depledge MH, Galloway TS (2005) Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin* 51:811-816
- Hannam ML, Bamber SD, Galloway TS, John Moody A, Jones MB (2010) Functional immune response in *Pecten maximus*: Combined effects of a pathogen-associated molecular pattern and PAH exposure. *Fish and Shellfish Immunology* 28:249-252
- Hannam ML, Bamber SD, Moody JA, Galloway TS, Jones MB (2009) Immune function in the Arctic Scallop, *Chlamys islandica*, following dispersed oil exposure. *Aquatic Toxicology* 92:187-194

- Hellio C, Bado-Nilles A, Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H (2007) Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol* 22:433-440
- Huggett R, Kimerle R, Mehrle Jr. P (1992) Biomarkers: biochemical, physiological and histological makers of anthropogenic stress, Vol. Lewis, Boca Raton
- Kappus H (1985) Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance, Vol. Academic Press, London
- Lacoste A, Jalabert F, Malham SK, Cueff A, Poulet SA (2001) Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *General and Comparative Endocrinology* 67:2304-2309
- Landrum P, Stubblefield C (1991) Role of respiration in the accumulation of organic xenobiotics by the amphipod, *Pontoporeia hoyi*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10:1019-1028
- Lessard RR, DeMarco G (2000) The significance of oil spill dispersants. *Spill Science and Technology Bulletin* 6:59-68
- Li M, Garrett C (1998) The relationship between oil droplet size and upper ocean turbulence. *Marine Pollution Bulletin* 36:961-970
- Luna-Acosta A, Bustamante P, Godefroy J, Fruitier-Arnaudin I, Thomas-Guyon H (2010a) Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed *in situ*. *Environmental Science and Pollution Research* 17:999-1008
- Luna-Acosta A, Rosenfeld E, Amari M, Fruitier-Arnaudin I, Bustamante P, Thomas-Guyon H (2010b) First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology* 28:719-726
- Marchand R (1998) Marketing of previous termsolid waste management services in Tingloy, the Philippines
- McHenry JG, Allen JA, Birkbeck TH (1986) Distribution of lysozyme-like activity in 30 bivalve species. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 85:581-584
- Meador J (2003) Bioaccumulation of PAHs in marine invertebrates. In: Douben P (ed) PAHs: An ecological perspective. John Wiley and son, NY, USA, p 392
- Michel J, Henry CB (1997) Oil uptake and depuration in oysters after use of dispersants in shallow water in El Salvador. *Spill Science and Technology Bulletin* 4:57-70
- Moore M, Pipe R, Farrar S, Thompson S, Donkin P (1987) Lysosomal and microsomal responses to oil-derived hydrocarbons in *Littorina littorea*. In: Capuzzo J, Kester D (eds) Oceanic processes in marine pollution, Vol 1. Robert E Krieger Publishing Company, Malobar, Florida, p 89-96
- Neff JM, Cox BA, Dixit D, Anderson JW (1976) Accumulation and release of petroleum-derived aromatic hydrocarbons by four species of marine animals. *Marine Biology* 38:279-289
- Neumann NF, Stafford JL, Barreda D, Ainsworth AJ, Belosevic M (2001) Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental & Comparative Immunology* 25:807-825
- Orbea A, Ortiz-Zarragoitia M, Solé M, Porte C, Cajaraville MP (2002) Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology* 58:75-98
- Page CA, Bonner JS, Sumner PL, McDonald TJ, Autenrieth RL, Fuller CB (2000) Behavior of a chemically-dispersed oil and a whole oil on a near-shore environment. *Water Research* 34:2507-2516
- Perdue J, Beattie J, Chew K (1981) Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *Journal of Shellfish Research* 1:9-16
- Pomerantz S (1963) Separation, purification, and properties of two tyrosinases from hamster melanoma. *The Journal of Biological Chemistry* 238:2351-2357

- Ramachandran SD, Hodson PV, Khan CW, Lee K (2004) Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59:300-308
- Richardson BJ, Mak E, De Luca-Abbott SB, Martin M, McClellan K, Lam PKS (2008) Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels "integrate" biomarker responses? *Marine Pollution Bulletin* 57:503-514
- Shafir S, Van Rijn J, Rinkevich B (2007) Short- and long-term toxicity of crude oil and oil dispersants to two representative coral species. *Environmental Science and Technology* 41:5571-5574
- Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B, Klenk D (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150:76-85
- Söderhäll K, Cerenius L (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10:23-28
- Sole M, Porte C, Albaiges J (1995) The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. *Science of the Total Environment* 159:147-153
- Soudant P, Paillard C, Choquet G, Lambert C, Reid HI, Marhic A, Donaghy L, Birkbeck TH (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
- Stabili L, Pagliara P (2009) Effect of zinc on lysozyme-like activity of the seastar *Marthasterias glacialis* (*Echinodermata, Asteroidea*) mucus. *Journal of Invertebrate Pathology* 100:189-192
- Thiagarajan R, Gopalakrishnan S, Thilagam H (2006) Immunomodulation the marine green mussel *Perna viridis* Exposed to sub-lethal concentrations of Cu and Hg. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51:392-399
- Venosa AD, Zhu X (2003) Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Science and Technology Bulletin* 8:163-178
- Verlecar XN, Jena KB, Chainy GBN (2007) Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chemico-Biological Interactions* 167:219-226
- Winston GW (1991) Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology* C 100:173-176

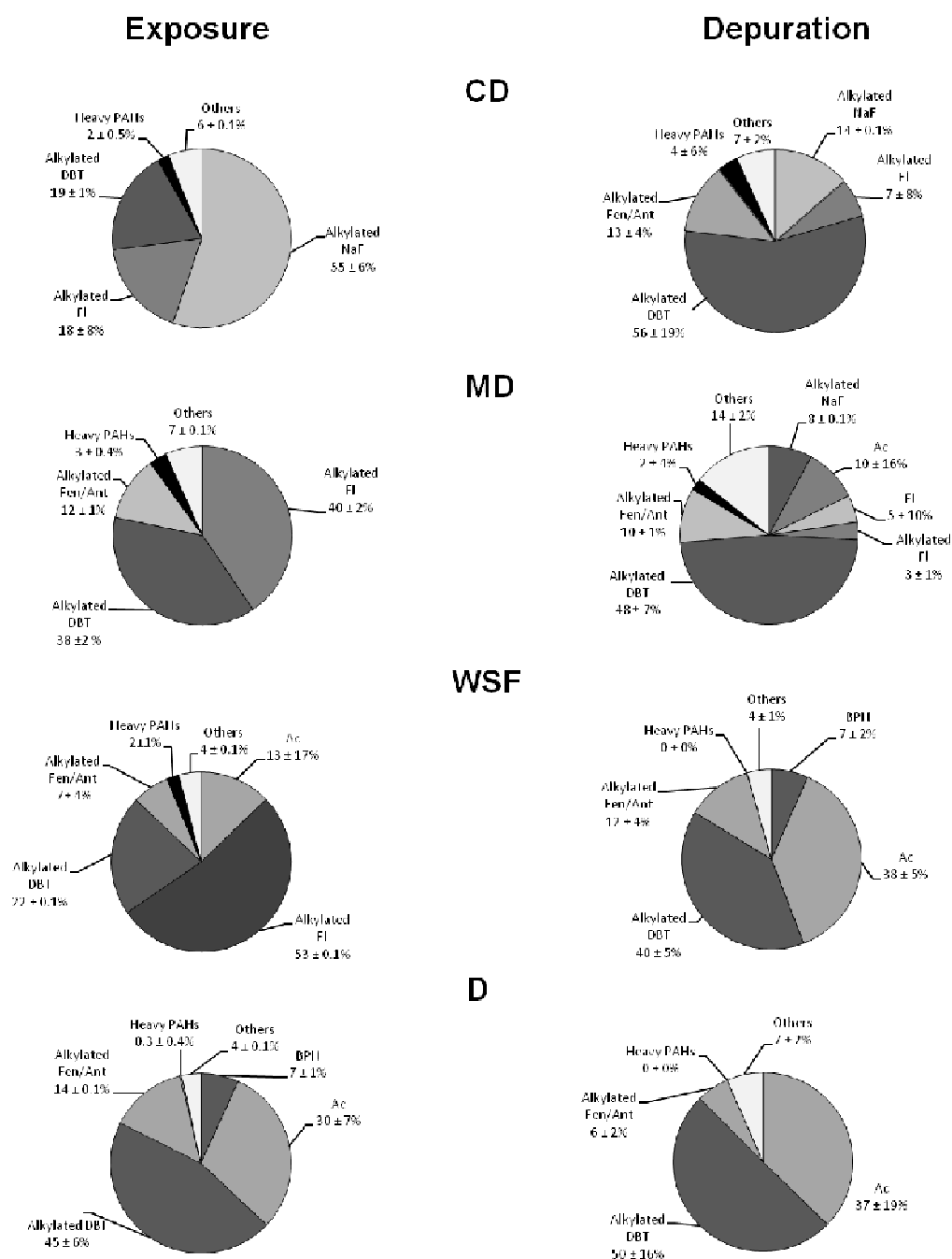


Figure 1 Proportion (%) of main PAHs present in oyster tissues (n=3) after 2 days of exposure and after 15 days of depuration to chemical dispersion (CD), mechanical dispersion, (MD), water soluble fraction (WSF) and dispersant (D).

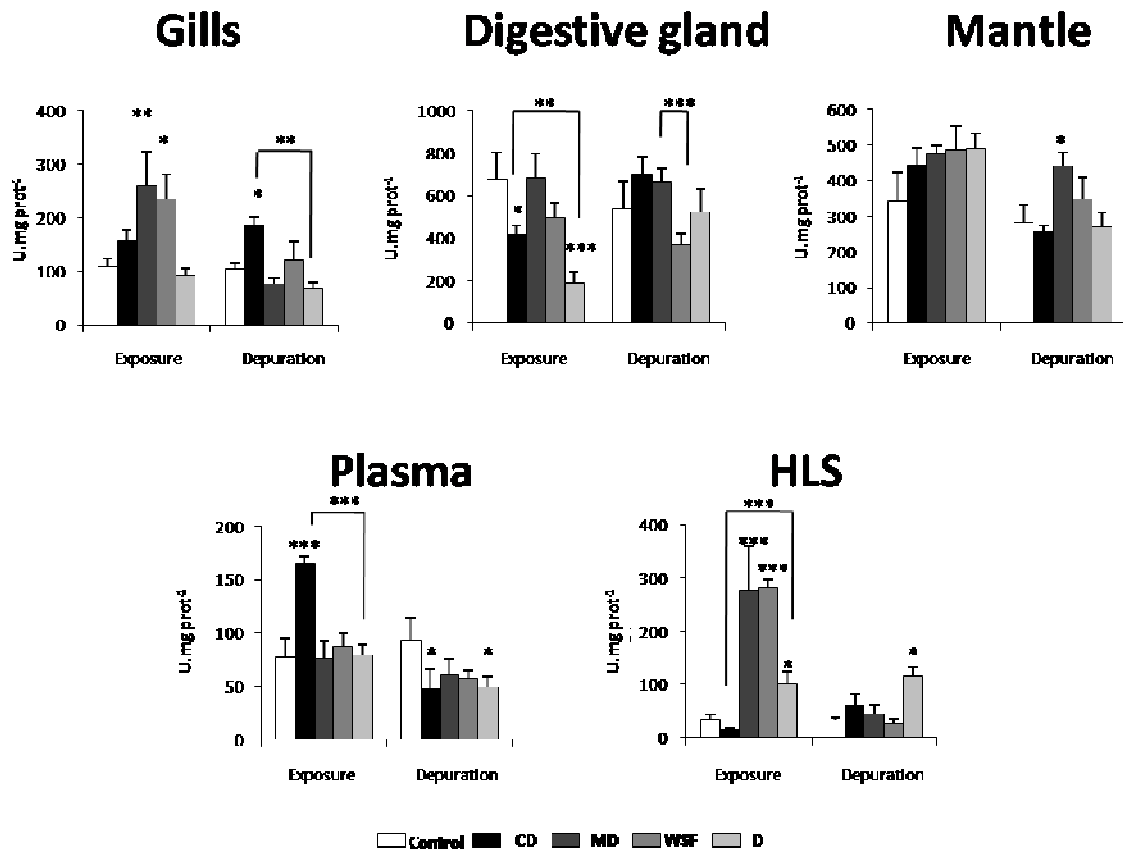


Figure 2 Superoxide dismutase activity in the gills, the digestive gland, the mantle, the plasma and the hemocyte lysate supernatant (HLS) in *C. gigas* after 2 days of exposure and after 15 days of depuration to chemical dispersion (CD), mechanical dispersion (MD), water soluble fraction (WSF) and dispersant (D) treatments. Data are expressed as mean \pm SD. For clarity of results, only significant differences between control and treatment, or between one treatment condition and its respective internal control, i.e. D for CD and WSF for MD, and for a given time (after 48h of exposure or after 15 days of depuration) are shown; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

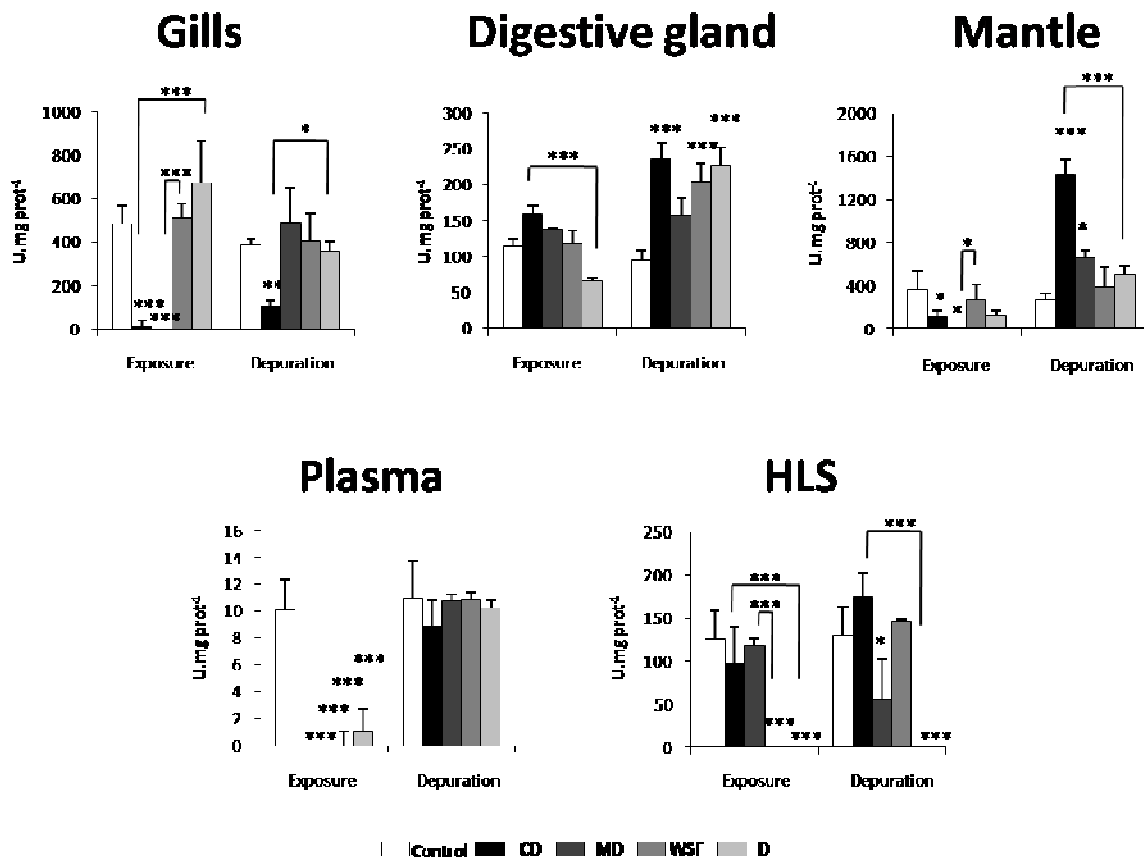


Figure 3 Catalase activity in the gills, the digestive gland, the mantle, the plasma and the haemocyte lysate supernatant (HLS) in *C. gigas* after 2 days of exposure and 15 days of depuration to chemical dispersion (CD), mechanical dispersion (MD), water soluble fraction (WSF) and dispersant (D) treatments. Data are expressed as mean \pm SD. For clarity of results, only significant differences between control and treatment, or between one treatment condition and its respective internal control, i.e. D for CD and WSF for MD, and for a given time (after 48h of exposure or after 15 days of depuration) are shown; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

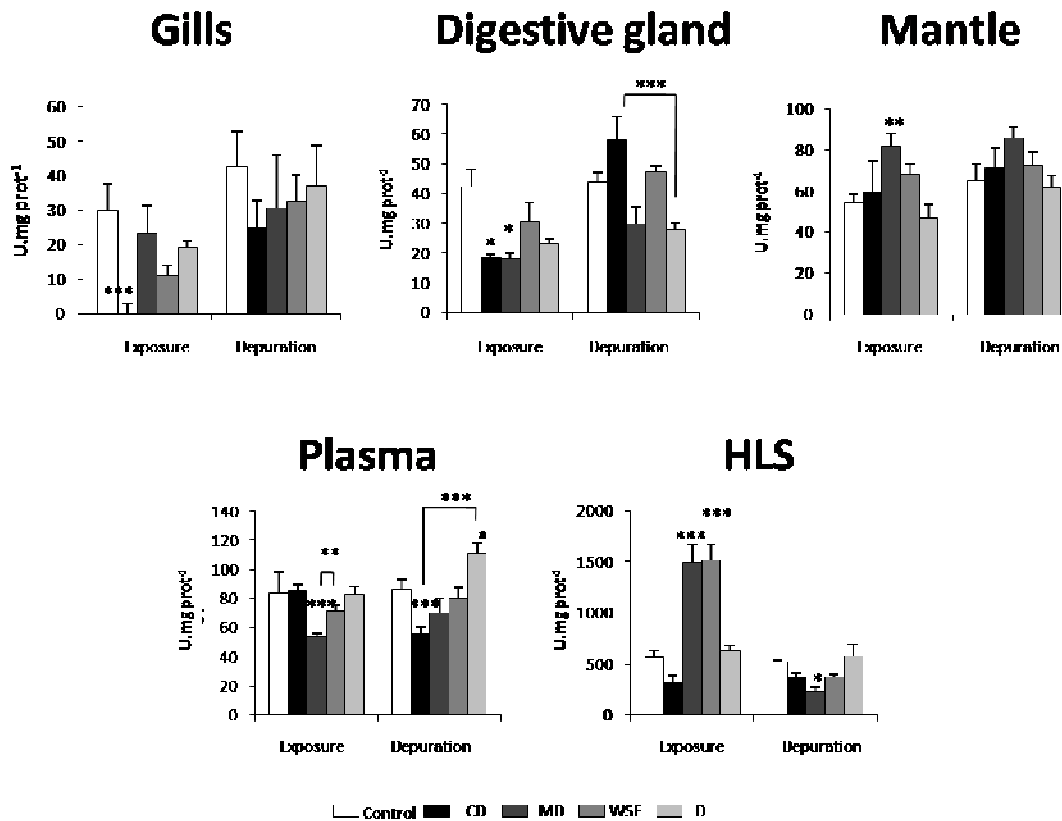


Figure 4 Glutathione peroxidase activity in the gills, the digestive gland, the mantle, the plasma and the haemocyte lysate supernatant (HLS) in *C. gigas* after 2 days of exposure and 15 days of depuration to chemical dispersion (CD), mechanical dispersion (MD), water soluble fraction (WSF) and dispersant (D) treatments. Data are expressed as mean \pm SD. For clarity of results, only significant differences between control and treatment, or between one treatment condition and its respective internal control, i.e. D for CD and WSF for MD, and for a given time (after 48h of exposure or after 15 days of depuration) are shown; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

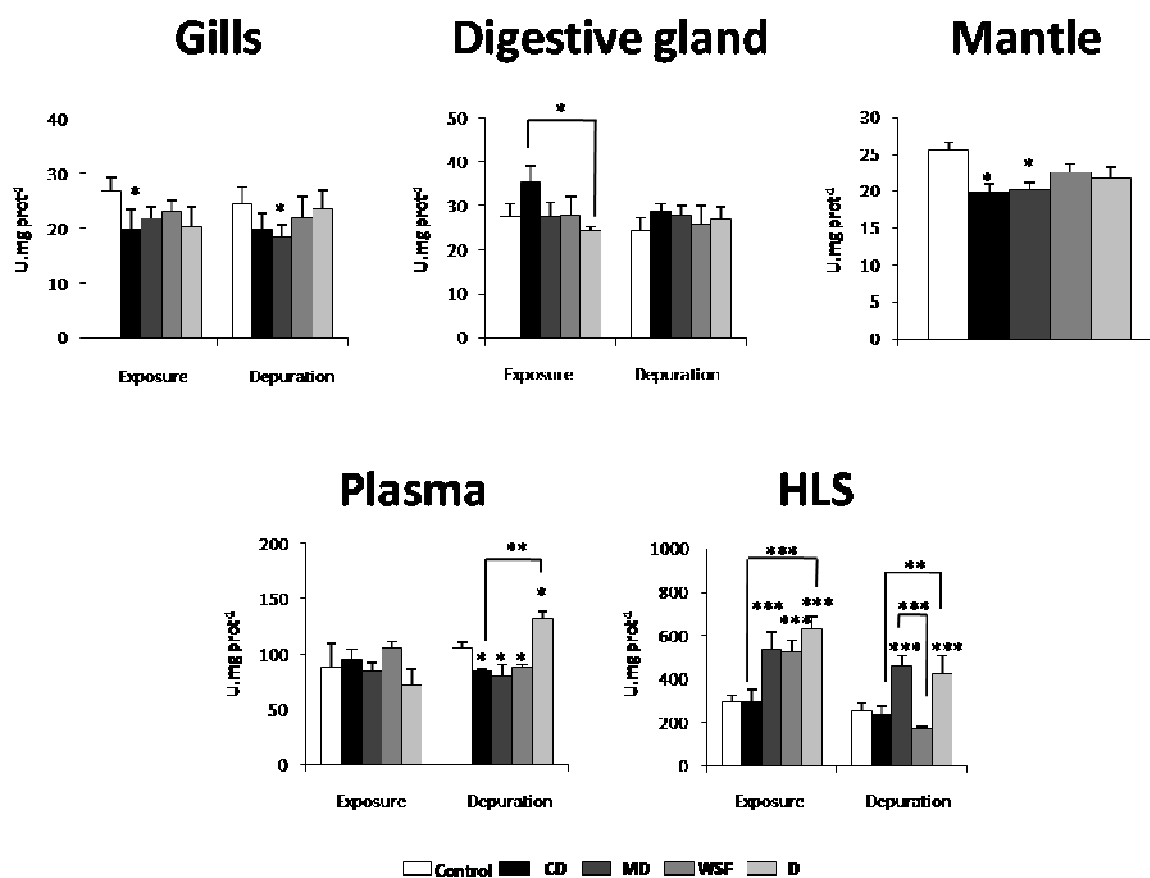


Figure 5 Catecholase-type phenoloxidase activity in the gills, the digestive gland, the mantle, the plasma and the haemocyte lysate supernatant (HLS) in *C. gigas* after 2 days of exposure and after 15 days of depuration to chemical dispersion (CD), mechanical dispersion (MD), water soluble fraction (WSF) and dispersant (D) treatments. Data are expressed as mean \pm SD. For clarity of results, only significant differences between control and treatment, or between one treatment condition and its respective internal control, i.e. D for CD and WSF for MD, and for a given time (after 48h of exposure or after 15 days of depuration) are shown; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

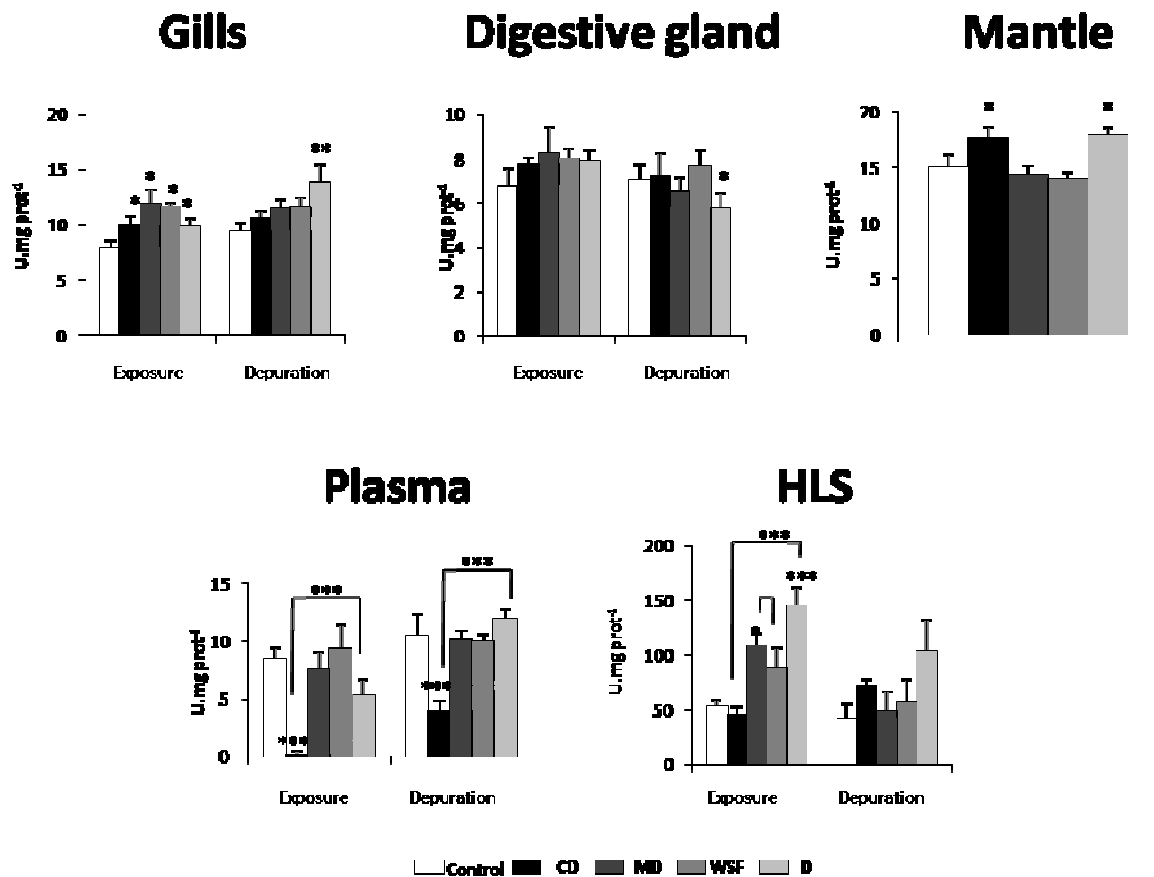


Figure 6 Laccase-type phenoloxidase activity in the gills, the digestive gland, the mantle, the plasma and the haemocyte lysate supernatant (HLS) in *C. gigas* after 2 days of exposure and after 15 days of depuration to chemical dispersion (CD), mechanical dispersion (MD), water soluble fraction (WSF) and dispersant (D) treatments. Data are expressed as mean \pm SD. For clarity of results, only significant differences between control and treatment, or between one treatment condition and its respective internal control, i.e. D for CD and WSF for MD, and for a given time (after 48h of exposure or after 15 days of depuration) are shown; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

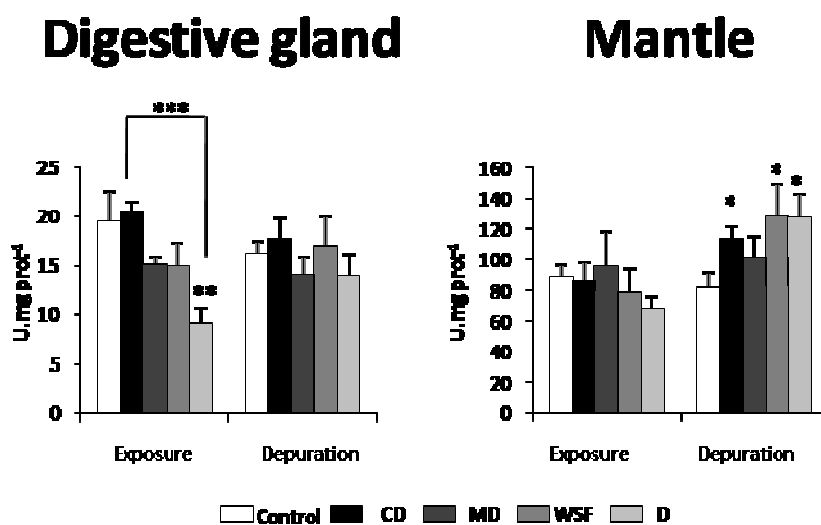


Figure 7 Lysozyme activity in the digestive gland and the mantle in *C. gigas* after 2 days of exposure and after 15 days of depuration to chemical dispersion (CD), mechanical dispersion (MD), water soluble fraction (WSF) and dispersant (D) treatments. Data are expressed as mean \pm SD. For clarity of results, only significant differences between control and treatment, or between one treatment condition and its respective internal control, i.e. D for CD and WSF for MD, and for a given time (after 48h of exposure or after 15 days of depuration) are shown; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Table 1 Experimental conditions used in the study. CD: chemical dispersion, MD: mechanical dispersion, WSF: water soluble fraction and D: dispersant. BAL 110: Brut Arabian Light crude oil topped at 110°C.

	Quantity of the product added to the water column (mg.l ⁻¹) [#]	
	BAL 110	Dispersant
Control	0	0
CD	66	4
MD	66	0
WSF (internal control of MD)	66	0
D (internal control of CD)	0	4

[#] In order to have a stable concentration of the products in the water column, the products were added 13 hours before introducing animals in the tanks

Table 2 PAH body burdens ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt) in whole tissues of *Crassostrea gigas* after a period of 2 days of exposure followed by 15 days of depuration. † US EPA priority pollutants. Lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) of the sum of PAH content in oyster tissues between treatment conditions and for a given period, i.e. contamination or depuration. CD: chemical dispersion, MD: mechanical dispersion, WSF: water soluble fraction and D: dispersant; <DL: below detection level.

PAHs (parents and alkylated)	Molecular weight ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight)									
		Exposure					Depuration				
		Control	CD	MD	WSF	D	Control	CD	MD	WSF	D
Naphthalene†	128.2	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C1-Naphthalene	143.2	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C2-Naphthalene	158.2	<DL	28±7	<DL	<DL	<DL	<DL	2±1	<DL	<DL	<DL
C3-Naphthalene	173.2	<DL	127±29	<DL	<DL	<DL	<DL	1±2	<DL	<DL	<DL
C4-Naphthalene	188.2	<DL	139±35	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Benzothiophene	134.2	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C1-Benzothiophene	149.2	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C2-Benzothiophene	164.2	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C3-Benzothiophene	179.2	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C4-Benzothiophene	194.2	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Acenaphthylene†	155.2	<DL	<DL	1±0	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Acenaphthene†	154.2	0.91±0.8	2±0	3±0	3±3	2±0	1±1	1±0	1±1	1±0	1±1
Biphenyl	154.2	0.23±0.24	<DL	1±0	<DL	1±0	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Fluorene†	166.2	<DL	1±0	1±0	1±0	<DL	<DL	<DL	1±2	<DL	<DL
C1-Fluorene	181.2	<DL	12±3	13±0	5±1	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C2-Fluorene	196.2	<DL	28±8	32±2	10±5	<DL	<DL	1±1	<DL	<DL	<DL
C3-Fluorene	211.2	<DL	51±16	47±3	13±18	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Phenanthrene†	178.2	0.25±0.04	2±0	1±0	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Anthracene†	178.2	0.07±0.12	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C1-Phenanthrene/Anthracene	193.2	1.13±0.35	8±1	6±1	1±1	1±0	<DL	1±0	<DL	<DL	<DL
C2-Phenanthrene/Anthracene	208.2	0.97±0.77	9±2	7±1	2±2	<DL	<DL	1±0	1±0	<DL	<DL
C3-Phenanthrene/Anthracene	223.2	0.38±0.33	5±1	4±1	1±1	<DL	<DL	<DL	1±0	<DL	<DL
C4-Phenanthrene/Anthracene	238.2	<DL	3±1	2±1	1±1	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Dibenzothiophene	184.3	0.07±0.02	1±0	1±0	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C1-Dibenzothiophene	199.3	0.93±0.33	26±4	18±3	4±5	1±1	<DL	1±0	<DL	<DL	<DL
C2-Dibenzothiophene	214.3	1.23±0.5	39±8	27±5	6±7	2±1	<DL	3±1	3±2	<DL	<DL
C3-Dibenzothiophene	229.3	0.74±0.24	27±7	18±2	5±6	1±1	<DL	3±1	4±2	<DL	<DL
C4-Dibenzothiophene	244.3	<DL	10±3	6±0	2±2	<DL	<DL	1±0	2±1	<DL	<DL
Fluoranthene†	202.3	0.01±0.01	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Pyrene†	202.3	0.12±0.06	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C1-Fluoranthene/Pyrene	217.3	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C2-Fluoranthene/Pyrene	232.3	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C3-Fluoranthene/Pyrene	247.3	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Benzo(a)anthracene†	228.3	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Chrysene†	228.3	<DL	2±0	1±0	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C1-Chrysene	243.3	<DL	3±1	2±0	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C2-Chrysene	258.3	<DL	4±1	4±0	1±1	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
C3-Chrysene	273.3	<DL	2±3	1±2	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Benzo(b+k)fluoranthene†	252.3	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Benzo(e)pyrene	252.3	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Benzo(a)pyrene†	252.3	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Perylene	252.3	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Benzo(g,h,i)perylene†	276.3	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	10±0	<DL	<DL	<DL
Indeno(1,2,3-cd)pyrene†	276.3	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	0±0	<DL	<DL	<DL
Dibenzo(a,h)anthracene†	278.4	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
∑ PAHs		7.04±1.03 ^a	530±75 ^b	198±22 ^c	56±50 ^a	8±3 ^a	3±0 ^a	15±6 ^b	14±6 ^b	2±0 ^a	2±2 ^a

Table 3 Correlations between PAHs contents in oyster tissues and enzyme activities at the end of the exposure period. When significant correlations were observed ($p < 0.01$), Spearman rank coefficients were reported; ns, not significantly correlated. Only enzyme activities or PAH contents presenting at least one correlation were presented. SOD: superoxide dismutase, CAT: catalase, GPx: glutathione peroxidase; NaF: naphthalene; Acny: acenaphthylene; Ac: acenaphthene; F: fluorene; DBT: dibenzothiophene; Fen: phenanthrene; Ant: anthracene.

		NaF	Acny	Ac	F	Alkylated Fl	DBT	Alkylated DBT	Fen	Ant	Alkylated Fen/Ant	Σ Light PAHs	Σ Heavy PAHs	Σ total PAHs
Gills	SOD	ns	0.77	ns	0.86	ns	0.52	ns	ns	ns	ns	ns	0.67	0.65
	CAT	ns	ns	ns	-0.65	-0.79	ns	-0.64	-0.69	ns	-0.69	-0.71	-0.72	-0.70
	GPx	-0.69	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Laccase	ns	0.68	0.65	0.75	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Lysozyme	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.65	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Digestive gland	CAT	0.69	ns	ns	0.65	0.85	0.74	0.73	0.82	0.72	0.83	0.89	0.88	0.88
	GPx	ns	ns	ns	ns	-0.73	-0.71	-0.74	ns	ns	ns	-0.76	-0.77	-0.78
	Catechol.ase	0.69	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.65	ns	0.65	0.70	0.64
Mantle	CAT	ns	ns	ns	ns	-0.65	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	GPx	ns	0.79	ns	0.83	0.69	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Plasma	SOD	0.70	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	CAT	ns	ns	ns	-0.76	-0.76	-0.68	-0.72	ns	ns	ns	-0.68	-0.68	-0.68
	GPx	ns	-0.83	ns	-0.67	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Laccase	-0.68	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Haemocytes	SOD	-0.68	0.79	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	GPx	-0.69	0.75	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Laccase	-0.66	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Table 4 Summary of inter-treatment comparisons between enzyme activity responses. SOD: superoxide dismutase, CAT: catalase, GPx: glutathione peroxidase; MD: mechanical dispersion; WSF: water soluble fraction; CD: chemical dispersion; D: dispersant; Exp: after the exposure period; Dep: after the depuration period; Exp+Dep: after exposure and depuration periods. HLS: haemocyte lysate supernatant. =: same effect, <: lower effect and >: higher effect. I: inhibition of the enzyme activity; A: activation of the enzyme activity.

		Inter-treatment comparisons								
		MD in comparison to WSF			CD in comparison to D			CD in comparison to MD		
		Exp	Dep	Exp+Dep	Exp	Dep	Exp+Dep	Exp	Dep	Exp+Dep
Gills	SOD	= A				< A	< A	< A		< A
	CAT				> I	> I	> I	= I	> I	> I
	GPx				< I		< I	> I		> I
	Catecholase	> I		> I	> I		> I	= I		= I
	Laccase	= A			< A	< A	< A	= A		= A
Digestive gland	SOD				< I		< I	> I		> I
	CAT		< A	< A		< A	< A	x	> A	> A
	GPx	> I		> I	> I		> I	= I		= I
	Catecholase				> A		> A	> A		> A
	Laccase					< I	< I			
Mantle	SOD					< A	< A			
	CAT	> I	> A	> I	> I	> A	> A	= I	> A	> I/A
	GPx	> A		> A				< A	x	< A
	Laccase							> A	> A	> A
	Lysozyme		< A	< A		= A	= A		> A	> A
Plasma	SOD				< A	= I	< A	> A	> I	> A/I
	CAT							> I		> I
	GPx	> I		> I		> I	> I	< I	> I	> I
	Catecholase		= I			> I	> I			
	Laccase				> I	> I	> I	> I	> I	> I
Haemocytes (HLS)	SOD	= A			< A	< A	< A	< A		< A
	CAT	< I	> I	> I	< I	< I	< I		< I	< I
	GPx	= A	> I	> I				< A	< I	< A/I
	Catecholase	= A	> A	> A	< A	< A	< A	< A	< A	< A
	Laccase	> A		> A	< A	< A	< A	< A		< A

Annexe 7 : Influence of contaminated mudflat with dispersed oil on defence mechanisms of oyster (*Crassostrea gigas*): an intertidal mesocosm experiment

Influence of contaminated mudflat with dispersed oil on defence mechanisms of oyster (*Crassostrea gigas*): an intertidal mesocosm experiment

Richard M.^{a,*}, Luna-Acosta A.^a, Prineau M.^a, Huet V.^a, Caupos, F.^a, Thomas-Guyon H.^a

^a Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

* Corresponding author. marionrichard_fr@yahoo.fr

Abstract

The aim of this study was to test the effect of contaminated mudflat with dispersed oil on defence mechanisms of the Pacific oyster, using large (4 m x 1m) intertidal devices. To this end, 2.4 m² of mudflat were contaminated with 265 mg.l⁻¹ of Arabian crude oil through water, during 48h with a tidal cycle of 6h/6h. Results showed that the contamination of mud was significant into the first centimeter and uneven. Total hydrocarbon content ranged from 0 to 530 ppm with a mean of 220 ppm, as reported in impacted coastal zones by oil spill. Oysters were exposed to these contaminated mudflats into a large intertidal mesocosm, and were randomly collected after 5, 7 and 10 days of exposition for enzymatical analysis in the acellular fraction of the haemolymph (plasma). Whereas none variation was observed among exposition time in the control mesocosm, a significant temporal variation was observed in the polluted mesocosm: in contaminated oysters, (i) superoxide dismutase (SOD) increased from 5 days to 7 days, (ii) glutathion peroxidase (GPx), catecholoxidase-type and laccase-type phenoloxidase (PO) activities increased after 10 days, and (iii) lysozyme activity decreased after 10 days. These results showed that oysters were contaminated by hydrocarbons through filtration of contaminated mud or released contaminants, exerting an effect on different enzyme activities implicated in immune defence mechanisms in this organism. Thus, as part of the effect assessment of chemical dispersant as cleaning agent of oil spills in coastal zones, this experimental device could be used for future experiments to test the effect of contaminated mud with dispersed and non dispersed oil on critical biological functions of marine organisms such as the Pacific oyster *C. gigas*.

Key words: petroleum, sediment, mollusc, mesocosm, biomarkers, humoral defences

1. Introduction

Coastal and estuarine areas, such as intertidal mudflats, constitute sensitive zones, by serving as feeding grounds for migratory waterfowls, as nurseries for economically important species, and by providing habitat for benthic organisms (Johnston 1981b). However, numerous accidental oil spills have occurred during the last 40 years in these sensitive zones (e.g. Torrey Canyon, UK, 1967; Amoco-Cadiz, France, 1978; Erika, France, 1999; Prestige, Spain, 2002). Organic compounds released into aquatic systems are known to bind to particulates and accumulate in sediments (Byrne & O'Halloran 2001). Thus, the estuarine sediments are considered as repositories and potential sources of anthropogenic contaminants that could exert an impact on marine organisms, especially on benthic and sessile species.

Among marine organisms, the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1973) is an economically and ecologically important species, inhabiting coastal and estuarine zones, such as intertidal mudflats (Soletchnik et al. 2005). As other marine bivalves, *C. gigas* is known to bioaccumulate contaminants in its tissues (Orbea et al. 2002) and due to its association with sediments, its sessile nature and its high filtration activity, *C. gigas* is likely to be constantly in contact with contaminants present in estuarine sediments (Jenny et al. 2002). Bioaccumulation of contaminants such as hydrocarbons have shown to affect internal defence mechanisms in different marine organisms (Auffret et al. 2002, Perez-Cadahia et al. 2004, Frouin et al. 2007, Ordas et al. 2007).

Indeed, the exposure, the bioaccumulation and the metabolization of hydrocarbons in an organism can lead, for example, to an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) (Sole 2000, Orbea et al. 2002). The generation of ROS can lead to the production of toxic macromolecules, which can cause different internal damages (Cazenave et al. 2006). The extent of these effects is, in turn, dependent on the effectiveness of antioxidant defences (e.g. superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx)), which participate to the transformation of ROS into non toxic molecules, and therefore, play a crucial role in maintaining cell homeostasis (Neumann et al. 2001). Therefore, inducibility of antioxidant enzymes is an important response to pollutant-induced stress, and antioxidant enzymes are often used as biomarkers of exposure in ecotoxicological studies (Sole 2000, Orbea et al. 2002).

In addition to that, bivalve molluscs possess different enzymes implicated in innate responses, which can play an important role in the metabolization and elimination of contaminants and encapsulation. Among these enzymes, POs are the key enzymes of melanization and are known to be implicated on invertebrate immune responses (Söderhäll & Cerenius 1998). This family of enzymes is composed of tyrosinases, catecholases and laccases and recently, the presence of catecholase and laccase activities in *C. gigas* (Hellio et al. 2007, Luna-Acosta et al. 2010a) were demonstrated, and were suggested to play a role in detoxification mechanisms of hydrocarbons in this species (Bado-Nilles et al. 2010). Lysozyme (N-acetylmuramide glycanhydrolase, EC 3.2.1.17) is one of the most important bacteriolytic agents against several species of Gram-positive and Gram-negative bacteria (Cheng & Rodrick 1974), has been recorded in various

bivalve species (McHenry et al. 1986), and is also known to participate in the metabolization of a range of xenobiotics (Hagger et al. 2005).

Different studies carried out in *C. gigas* have shown that immune defence mechanisms such as antioxidant enzymes (e.g. superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx)), PO and lysozyme activities, can be affected at molecular and biochemical levels by the presence of hydrocarbons (Boutet *et al.* 2004, Bado-Nilles *et al.* 2008a). These internal defences may prevent also infection diseases and eliminate pathogen agents (Pipe *et al.* 1999). Thus, disease and survival of an organism is determined partly by the condition of its immune system and the measurement of defence mechanisms can provide important early warning signals of the sub-lethal effects of exposure to contaminants and the susceptibility of animals to infectious diseases (Gagnaire *et al.* 2007, Hannam *et al.* 2009, Luna-Acosta *et al.* 2010b).

Generally, studies in *C. gigas* have been carried out by exposing animals to of hydrocarbons *via* contaminated seawater, giving an insight on the effects of direct contamination through water (Boutet *et al.* 2004, Bado-Nilles *et al.* 2008a). However other bioaccumulation pathways such as the ingestion of contaminated particles (eg. sediment or microphytobenthos), or filtration of released compounds by the sediment should be taken into consideration for epibenthic organisms, such as oysters. Some studies have being carried out on marine organisms with sediments artificially contaminated by mixing using small devices that are not equipped with a system of tidal cycle (Sami et al. 1993, Cuny et al. 2007, Lekunberri et al. 2010). The use of this type of equipment presented different inconvenients. Firstly, artificial contamination by mixing lead to homogeneous repartition of contaminants into sediment that was probably not representative from natural conditions where contaminant dispersion is probably spatially heterogeneous. Secondly the low water capacity of this type of small devices could not permit to work during long period with high biomass of organisms because of a potential organism stress due to the increase of ammonium concentration into devices due to their high nitrogen excretion rate. Moreover, this type of equipment did not mimic the environmental conditions of intertidal mudflats where bivalves were successively immerged and emerged according to tidal cycles. Contamination of epibenthic organisms was probably not the same in subtidal and intertidal zones. Tidal cycles could favor (*i*) the development of microphytobenthos and (*ii*) the release of contaminants by the sediment, which could increase the contamination pathways. Mesocosms constitute large enclosed systems that mimic the environment. They are considered as important research tools for the evaluation of the fate and the effects of contaminants at the different levels from the individual to the population, near from the ecosystem (Cappello & Yakimov 2010).

In this general context, the aim of this study was to test the potential effects of contaminated mudflat with dispersed oil on antioxidant and immune mechanisms in the acellular fraction of the haemolymph of the Pacific oyster *C. gigas*. To our knowledge, this study is the first one to use intertidal mesocosms that mimics (*i*) contamination of mudflats by dispersed oil and (*ii*) exposition of oysters to contaminated mudflats.

2. Material and methods

2.1. Experimental devices

Experimental mudflats

Mud was collected at low tide at mudflats of Esnandes (Charente Maritime, France). Mud was collected into the first centimetres of the oxic layer with spade. Thus, twenty 20L-buckets of mud were transferred to the experimental facilities of IFREMER/CNRS in L'Houmeau (France). The mud of each bucket was firstly mix with a stick. It was next progressively transferred into twenty plastic trays (60 x 40 x 5 cm) to obtain a homogenate mud among trays. The mean mud weight per tray was above 12 kg. Two experimental mudflats were thus created thanks to the assemblage of 10 trays (5 x 2) on a 2.4 m². Note that (i) a cross of twenty holes (7 mm Ø) was carried out in the bottom of each tray, and (ii) a meshed tissue was deployed on the tray bottom before the mud transfer, to permit an irrigation of the sediment during low tide, without mud loose.

Pollution device equipped with tidal cycles

Mud trays were transferred into two large devices located under a greenhouse to facilitate the microphytobenthos development. The two devices were composed of a long principal tank (300 x 80 x 25 cm) and an adjacent water tank (120 x 80 x 65 cm; Figure 1). They were equipped with a system of tidal cycles, by using a controlled pump (Eheim compact 1000L.h⁻¹) with a mechanical timer (IDK PMTF 16A). This pump was located in the adjacent tank that was filled with 400 water liter (Fig. 1). In "On" mode, the pump permitted to fill the principal tank thanks to a long hose (16 mm Ø). A circulation of water was created thanks to a hole (7 mm Ø), located at the opposite of the water arrival, and on the bottom of the principal tank (Fig. 1). The level of water was regulated into the long tank thanks to an evacuation tube (16 mm Ø) of 15 cm height (Fig. 1). This is the high tide. In "OFF" mode, principal tank emptied with gravity thanks to the bottom evacuation hole. It is the low tide. The tide cycle was composed of 6 hours of low tide and 6 hours of high tide with two tides per day. Low tides were scheduled from 9 am till 3 pm, and from 9 pm till 3 am. In contrast, high tides were scheduled from 3 pm till 9 pm and from 3 am to 9 am.

After two days of microphytobenthos production, 106 g Arabian light crude oil, topped at 110°C and 5% of dispersant (5.3 g) were mixed into the same bottle and added at ebb tide at the water surface of the large tank of one of the both production devices. Contamination duration was 48 hours; it corresponds to the reaction time of antipollution procedures.

Exposition devices: Mesocosms

After a first period of 48h of production and 48h of contamination into first devices, mud trays were transferred into two mesocosms. One of them contained polluted mud trays whereas the other one contained non contaminated mud trays. Mesocosm dimensions were 400 x 220 x 100 cm. It was composed of i) a mud compartment where the mud trays were deployed, and ii) a 100 x 100 x 50 cm pool which surface level corresponded to the

level of mud trays (Figure 2). Three windows were installed all along the mud compartment to permit visual observations. Mesocosm was linked to an adjacent tank (160 x 100 x 80 cm) via long 25 mm Ø hose. Mesocosm was equipped with a system of tidal cycles thanks to a controlled pump (Eheim 1262, 3400l.h⁻¹) with a mechanical timer. When the pump was in function, the water passed from the adjacent tank to the mud compartment via the pool to finish in the adjacent tank thanks to an evacuation hole, located at 20 cm height (Figure 2). Another evacuation hole was located at the surface level of the pool, ie. at the level of tray bottom. This hole permitted to empty the mesocosm when the pump is turn off. It is the low tide. The schedule of tidal cycle was the same in the mesocosm than in the production device. Before the use of the mesocosm, pool and adjacent tank were filled with seawater. Water temperature was regulated at 15°C by a TR 60 TECO (Figure 2). Pool was aerated with two 10 cm-diffusers during all the experiment.

2.2. Experimental designs, field sampling and storage

Sediment

Six sediment samples were collected per (i) treatment (TR: C: control, P: polluted mudflat) and (ii) TIME with 0 (corresponding to 48 hours of mud contamination), 5 and 10 days of experimentation into mesocosms, as levels. Thus 36 samples were collected for this experiment.

Sediment was collected using a cut off 60 ml disposable syringe to determine the hydrocarbon concentration in the top 1 cm of sediments. Samples were stored in petri-box, covered with aluminium sheet at -80°C. Samples were next lyophilized at 55°C during 48 hours before analysis.

Valvometer

An autonomous valvometer (Micrel) was used to record the valve activity of oysters (Gouletquer *et al.* 1998, Le Moullac 2008). This system was programmed via the WIMNEMO software. It monitored individually and continuously the valve activity of 6 oysters. The first day (0), the valvometre was installed at low tide inside the control mesocosm. At 5 days, the data were downloaded, the system was newly programmed and was next transferred into the polluted mesocosm. The data were downloaded the 7th days.

Haemolymph of oyster

A 2 x 3 factorial experiment was carried out into the two mesocosms. The first factor was TR, with non exposed (C) and exposed oyster (P) to polluted mudflat as levels (Figure 3). The second factor was TIME with 5, 7 and 10 days of exposition to mudflats (referred to as 5, 7, 10) as levels (Figure 3). Three lots of five oysters were randomly caught per mesocosm and per date. Thus 90 oysters were collected for this experiment.

At each sampling date, oyster was collected and be opened by cutting off the adductor muscle. Haemolymph was withdrawn directly from the pericardial cavity with a 1-ml syringe equipped with a needle (0.9 # 25 mm). Haemolymph samples were conserved on

ice during collection to prevent haemocyte aggregation. The haemolymph of oysters was pooled per lot of five oysters to reduce inter-individual variation and to provide sufficient haemocytes to fulfil assay requirements. Haemolymph samples were centrifuged (260 g, 15 min, 4 °C, Gagnaire 2005) to separate the cellular fraction (i.e. haemocytes) from plasma. Aliquots of plasma were stored in Eppendorf tubes at -80 °C.

2.3. Laboratory processing

Hydrocarbons

Lyophilized sediment was crushed and homogeneously mixed with a pestle. A subsample of 2.5 g was put in a beaker with 10mL of dichloromethane pestipur quality (DCM; Carlo Erba Reactif, SDS) to extract Total Petroleum Hydrocarbons (TPH), which is the sum of dissolved hydrocarbon plus the oil droplets. Extraction duration was 10 minutes in a Ultrasonic cuve (Ney). The solution were dried with anhydrous sulphate. Solution was next filtered through paper thanks to a funnel. Optical density (OD) of the sample was next measured using a UV spectrophotometer (UV-Vis spectrophotometer, Unicam) at 390 nm. Standard curve was established according to the optical density of ten different concentrations of TPH extracted in 10 ml DCM. The equation of the linear relation was $OD = 0.122 \times \text{mgHC}/10 \text{ ml}^{-1}$. Regression coefficient was 0.99. Extracted TPH was reported to the dry weight of the sub-sample sediment and was expressed in mgHC.kg^{-1} of sediment dry weight. The mean concentration observed in control sediment (C), issue to Chla interferences, was subtracted to the concentrations observed in polluted mudflat (P).

Haemolymph assay: Antioxidant and immune responses

Superoxide dismutase (SOD)

SOD was determined by an indirect method (Therond et al. 1996), based on competition of SOD with iodonitrotetrazolium (INT) for dismutation of superoxide anion (O_2^-). In the presence of O_2^- , INT is reduced into a red formazan dye that can be measured at 505 nm at 25°C (Kit Ransod SD 125, Randox, France). One unit of SOD is defined as the amount of enzyme that promotes a 50% decrease in the rate of INT reduction.

Glutathione peroxidase (GPx)

GPx activity was determined according to the method of Paglia & Valentine 1967). In the presence of glutathione reductase and substrates (i.e., reduced glutathione and cumene hydroperoxide), the decrease of absorbance at 340 nm is proportional to the reduction of the oxidised glutathione by NADPH, H⁺ (Kit Ransel RS 504, Randox, France). One unit of GPx oxidises 1 μmol of NADPH ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) per minute.

Catecholase-type and laccase-type phenoloxidase (PO)

Catecholase-type phenoloxidase (PO) and laccase-type PO activities were determined according to the method of Asokan *et al.* (1997), with slight modifications (Luna-Acosta et al. 2010a). Catecholase-type PO activity assay was carried out in triplicate for each sample in the presence of 100 mM dopamine and 0.1 M Tris HCl buffer, pH 7.0 (0.45 M NaCl, 26 mM MgCl_2 , 10 mM CaCl_2 ; Sigma-Aldrich, France). Catecholase-type PO activity was followed by monitoring the increase of absorbance at 490 nm for 4 h. Laccase-type PO activity assay was carried out in triplicate for each sample in the presence of 50 mM PPD,

diluted in methanol, and 0.1 M Tris HCl buffer, pH 7.0 (0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂; Sigma-Aldrich, France). Laccase-type PO activity was followed by monitoring the increase of absorbance at 420 nm for 2 h. Nonenzymatic oxidation by the substrate was followed in wells without oyster sample and subtracted to oxidation of the substrate with oyster sample. One unit of catecholase-type PO and one unit of laccase-type PO specific activities correspond to the amount of enzyme that catalyzes the production of 1 μmole of product ($\bullet=3,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and $43,160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectively), per minute and per milligram of protein (Pomerantz 1963, Fenoll et al. 2002).

Lysozyme

Lysozyme assay was done in triplicate for each sample and compared against hen egg white lysozyme standards (0.4-40 μg.ml⁻¹), in the presence of *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, France). One unit of lysozyme corresponds to the amount of enzyme that diminishes absorbance at 450 nm of 0.001 per minute at pH 7.0, at 25°C (Soudant et al. 2004).

Protein

All activities were expressed in relation to protein concentration measured according to the Lowry method with slight modifications, by using bicinchoninic acid and copper sulphate 4% (Smith *et al.* 1985). Serum albumin was used as standard (Sigma-Aldrich, France).

Analysis was carried out using micro-cuve plaques and SAFAS Xenius spectrophotometer. Each analysis was replicated three times and mean per pool, nested into levels of TR and TIME.

2.4. Statistical analysis

The assumptions of normality and homoscedasticity were evaluated using Shapiro-Wilk and Brown-Forsythe tests, respectively (Zar 1984). When required, data were transformed to satisfy both assumptions. ANOVAs were next performed to test the influence of (i) treatment (TR), (ii) time (TIME), and (iii) their interactions (TR x TIME) on hydrocarbons contents into sediments and on haemolymph parameters (biomarkers). Tukey's HSD (honestly significant differences) pairwise multiple comparison tests were used to identify the differences when a source of variation was significant ($P < 0.05$). Multi-correlation tests were also carried out among five biomarkers using Rho-Spearman tests. The error risk α was re-evaluated to α' according to the Bonferroni correction, using the following formula: $\alpha' = 1 - (1 - \alpha)^{(1/N)}$ where global error risk $\alpha = 0,05$ and correlation number $N = (n^2 - n)/2$ with n as variable number. Thus, with 5 variables, 10 pairwise correlations have been tested and α' was 0.005 (Zar, 1984).

3. Results

3.1. Hydrocarbons

ANOVAs showed that mean of hydrocarbon content varied significantly according to treatment (TR: $p = 0.0003$) but not according to TIME ($p = 0.28$) with highest values

observed in polluted mud (P) than in control muds (C). Whatever the time (0, 5 or 10 days), mean total hydrocarbon content in the first centimetre of contaminated mud (\pm SD) was 220.1 ± 173.1 mg. kg dry sediment⁻¹.

3.2. *Valvometer: Observation of valve mobility*

Figure 4 showed that valves of oysters opened and closed according to time. Indeed, the valves of the six oysters were opened during high tide and closed during low tide into the both mesocosms.

3.3. *Haemolymph assay: Antioxidant and immune responses*

Mean protein concentration (mean \pm ES = 4.7 ± 0.5 mg.ml⁻¹) did not vary according to the both studied factors from the ANOVA results (TR and TIME; $p = 0.72$). Each studied enzyme activity varied significantly among the interaction of the both factors TR x TIME (SOD: $p = 0.006$, GPx: $p < 0.0001$, catecholase = $p < 0.0001$, laccase: $p = 0.025$, lysozyme: $p = 0.035$).

GPx, catecholase, laccase and lysozyme activities did not vary significantly according to TIME in the haemolymph of non-exposed oysters (C: Table 1). High standard deviation of SOD could not permit to distinguish the means among TIME in C treatment. Thus, as the other enzyme activities, mean SOD activity did not varied according to TIME in C. In contrast, all the studied enzyme activities varied significantly among TIME in the haemolymph of oysters exposed to contaminated mudflat (P: Table 1). Maximum SOD means were observed at 5 and 7 days. Because of the high standard deviations of means, mean did not differed according to time between 5 and 7 days. Nevertheless, the highest mean SOD seemed to be observed at 7 days (Table 1) whereas minimal means were noted at 10 days.

A posteriori HSD tests showed that mean GPx, catecholase and laccase activities increased with time in the haemolymph of organisms exposed to contaminated mudflat (P), with higher means observed at 10 days (Table 1). In contrast, lysozyme activity decreased with time, with a lowest mean observed at 10 days.

In contrast to SOD and laccase, GPx, catecholase and lysozyme varied significantly according to TR from the 10th day. Whereas mean GPx and catecholase activities were higher in oysters exposed to contaminated mudflat (P) than in non-exposed organisms (C), mean lysozyme activity was lower (Table 1).

Results of the multiple-correlation tests showed that the correlation between catecholase-laccase, catecholase-GPx and catecholase-GPx were significantly and positively linear (Table 2).

4. Discussion

The first objective of this study was to mimic the contamination of mudflats by dispersed oil using an intertidal mesocosm to significantly contaminate the mud. After 48h of contamination, hydrocarbon was significantly observed in the first centimeter of

contaminated mud. Concentration of total hydrocarbon was quite uneven and ranged from 0 to 533 mg.kg⁻¹ (ppm) with a mean of 220 ppm. This type of range and spatial variability of sediment oil content has often been reported in intertidal zones where total hydrocarbon content into sediment could range from (i) 10 to 520 mg.kg⁻¹ after the North Cape oil spill (Michel & Henry 1997), or from (ii) 195 to 968 mg.kg⁻¹ after the Tasman Spirit oil spill (Tasman Spirit Oil Spill Impact Evaluation Committee 2003). Thus, working on big structures such as mesocosms appears more widespread than using microcosms or small aquariums for a better understanding of environmentally relevant impacts of contaminants, without a direct *in situ* threat (Cappello & Yakimov 2010). This study validated the efficiency of the used contamination system.

The second objective of this study was to test the influence of the contaminated mudflat by dispersed oil on the defence mechanisms of oysters using and intertidal mesocosms. In both mesocosms (controlled vs. polluted), oysters were subjected to artificial tidal cycles, with a high tide and a low tide of 6 hours. Valvometer data showed that valve opening and closing was synchronized to these tidal cycles, as ever shown by Gouletquer et al. (1998). Valve activity is considered as a biological early warning system which might detect abnormal and/or stressful conditions for shellfish (e.g., pollutants or hypoxic conditions; Baldwin & Kramer 1994). Indeed, bivalves may close their valves as a defence mechanism to prevent xenobiotic intrusion. Thus, valve closure responses have been used as aquatic pollution biosensors (Tran et al. 2003). For instance, an experiment carried out in *C. gigas* showed that an exposure to 200 µg.l⁻¹ of PAHs induced valve closure (Jeong & Cho 2007). In the present study, no effect on valve activity was observed for oysters exposed to contaminated mudflat in the polluted mesocosm. Releases of dissolved hydrocarbons by the sediment are probably not large enough to induce the closing of oyster valves. Consequently, oyster tissues were really exposed to hydrocarbons into the polluted mesocosm. In addition to this result, no significant variation of the studied enzyme activities was recorded into the control mesocosm and confirmed that no oxidative stress was induced on oysters from the experimental device. In contrast, the activity of the studied antioxidant enzymes varied according to time into the polluted mesocosm, confirming that the exposition of oysters to oiled sediment induced a cascade of defence mechanisms in oysters.

SOD is an important antioxidant enzyme that catalyzes the dismutation of the superoxide anion radical (O₂⁻) to hydrogen peroxide (H₂O₂) plus water (H₂O) (Neumann et al., 2001). In the present study, SOD activity increased in oysters exposed to contaminated mud after 7 days of exposure. These results are in agreement with different studies that have shown an increase in SOD activity in bivalves exposed to hydrocarbons (Sole 2000, Orbea et al. 2002, Richardson et al. 2008), due probably to the metabolization of hydrocarbons into quinones and redox cycling derivatives (Livingstone et al. 1990). After 10 days of exposure, SOD activity decreased, suggesting a saturation of the system because of the presence of hydrocarbons, i.e. an overwhelming of this antioxidant enzyme by oxygen radicals, or an immunodeficiency traduced by a direct or an indirect inhibition of mechanisms that modulate this enzyme activity (Huggett et al. 1992, Brousseau et al. 1999).

Among other well-known antioxidant enzymes, glutathione peroxidase is an enzyme that participates in the removal of H_2O_2 by coupling its reduction to H_2O with oxidation of reduced glutathione (GSH). In the present study, GPx activity was significantly higher in oysters exposed to contaminated mudflat than in non-exposed organisms. This result is in agreement with Cheung et al. (2001) where an increase in GPx activity was observed in gills and in the digestive gland of mussels exposed to hydrocarbons (Cheung et al. 2001), supporting the hypothesis that hydrocarbons induce an oxidative stress by producing ROS such as H_2O_2 .

Among other enzymes implicated in defence mechanisms in bivalves, POs play an important role in humoral immune responses (Söderhäll & Cerenius 1998). In the present study, an increase in catecholase and laccase activities were observed in the pollution condition after 10 days of exposure. These results differ with other studies in *C. gigas* where the exposure to hydrocarbons induced an inhibitory effect in PO activities (Bado-Nilles et al. 2008, Bado-Nilles et al. 2009). In contrast, Coles & Pipe (1994) has previously shown that fluoranthene induces an *in vivo* increase of catecholase-type PO activity in the blue mussel, *M. edulis* and an *in vitro* study carried out in *C. gigas* revealed that plasmatic catecholase-type PO activity can be increased by the presence of PAHs such as naphthalene, benzo[b]fluoranthene and dibenz[a,h]anthracene (Bado-Nilles et al. 2008). Moreover, the exposure of *C. gigas* to a light cycle oil (LCO) soluble fraction induced an increase in the mRNA expression of laccase gene after seven days of exposure (Bado-Nilles et al. 2008). Since laccases can catalyze oxidation of aromatics, such as PAHs, by an indirect mechanism involving the participation of an oxidative mediator (Dodor et al. 2004), the authors suggested that an increase of laccase gene transcription in *C. gigas* may enable a protection against bioaccumulated PAHs. The effects observed in the polluted condition after 10 days of exposure for catecholase and laccase activities and the results of the multiple-correlation tests showing correlations between catecholase, laccase and GPx activities suggest that catecholase and laccase activities in *C. gigas* could also be implicated in antioxidant defences and/or in detoxification mechanisms.

Lysozyme plays an important role in humoral immune defence mechanisms in molluscs and is also implicated in detoxifying mechanisms of xenobiotics (McHenery et al. 1986, Hagger et al. 2005). In the present study, an inhibition in lysozyme activity was observed after 10 days of exposure to oil contaminated mud. These results are in agreement with previous studies that have shown an inhibition in lysozyme activity or in lysozyme gene expression in organisms exposed to hydrocarbons (Boutet et al. 2004, Gopalakrishnan et al. 2009). The reduction in lysozyme activity may suggest an immunosuppression, resulting in lowered resistance to bacterial challenge and/or impairment in the detoxification process, resulting in damage to the cell (Moore et al. 1987).

5. Conclusion and perspectives

The aims of the present study were to study a new experimental system for ecotoxicological studies of dispersed oil in estuarine areas by using intertidal mesocosms. The contamination of muds and the exposure of oysters to oil were validated by chemical and behavioral measurements. Moreover, changes in immune defence mechanisms at the

biochemical level observed in this study, namely catecholase, GPx and lysozyme activities, which illustrate their potential use in assessing the subtle effects of dispersed oil exposure. Effects on SOD and laccase activities were observed in the polluted condition in response to the time of exposure, suggesting that increasing the time of exposure (i.e. > 10 days) should be taken into consideration. Moreover, it is well-known that, when antioxidant defences are impaired or when the generation of ROS overwhelms antioxidant defence responses, oxidative stress may result in enzyme inactivation, lipid peroxidation, DNA damage or cell death (Cazenave et al. 2006). Thus it should be interesting to measure other parameters such as lipid peroxidation (Cheung et al. 2001). Finally, the results of the present study demonstrated that short-term exposure to sub-lethal concentrations of dispersed oil can alter biochemical constituents of immune defence mechanisms in the Pacific oyster *C. gigas*. Thus, comprehensive assessment of the effects associated with the use of dispersant as a control measure to oil spills in coastal and estuarine zones should be addressed in the future.

Acknowledgments

This study was funded by the DISCOBIOL ANR, coordinated by FX Merlin (CEDRE, Brest) and was possible according to the CNRS INEE grant received for the post-doctoral fellowship of M. Richard. Authors thanks C. Dupuy and C. Lefrançois to lend us the control mesocoms and the associated thermo-regulators that were used during the VASIREMI ANR program. Authors thank D. Vilday, T. Milinkovitch, J. Godefroy for their help in the field. Valvometer was lended by the IFREMER (LERPC, La Tremblade). So, thanks to I. Bernard, J-M Chabirand, O. Courtois, J-L Gaignon, S. Guesdon, P. Soletchnik (IFREMER, LERPC). Finally, authors thank M-L Bégout and X. Cousin (IFREMER, INRA, L' Houmeau) to lend us materials for bivalve maintaining.

References

- Asokan R, Arumugam M, Mullainadhan P (1997) Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Developmental and Comparative Immunology* 21:1-12
- Auffret M, Mujdzic N, Corporeau C, Moraga D (2002) Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine Environmental Research* 54:585-589
- Bado-Nilles A, Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Le Floch S, Renault T (2008) Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicology in Vitro* 22:1610-1617
- Bado-Nilles A, Quentel C, Auffret M, Le Floch S, Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H (2009) Immune effects of HFO on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:1446-1454
- Bado-Nilles A, Renault T, Faury N, Le Floch S, Quentel C, Auffret M, Thomas-Guyon H (2010) *In vivo* effects of LCO soluble fraction on immune-related functions and gene transcription in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* 97:196-203
- Baldwin IG, Kramer KJM (1994) Biological early warning systems (BEWS). In: *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*, Boca Raton p1-28
- Boutet I, Tanguy A, Moraga D (2004) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329:147-157

- Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Fournier M (1999) Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. *Toxicology* 142:145-156
- Byrne PA, O'Halloran J (2001) The role of bivalve molluscs as tools in estuarine sediment toxicity testing: A review. *Hydrobiologia* 465:209-217
- Cappello S, Yakimov MM (2010) Mesocosms for oil spill simulation. In: Timmis KN (ed) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, p 3513-3521
- Cazenave J, Bistoni M, Zwirnmann E, Wunderlin D, Wiegand C (2006) Attenuating effects of natural organic matter on microcystin toxicity in zebra fish (*Danio rerio*) embryos - benefits and costs of microcystin detoxication. *Environmental Toxicology* 21:22-32
- Cheng T, Rodrick J (1974) Identification and characterization of lysozyme from the hemolymph of the soft-shelled clam *Mya arenaria*. *Biological Bulletin* 147:311-320
- Cheung CCC, Zheng GJ, Li AMY, Richardson BJ, Lam PKS (2001) Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology* 52:189-203
- Coles J, Pipe R (1994) Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Fish and Shellfish Immunology* 4:337-352
- Cuny P, Miralles G, Cornet-Barthaux V, Acquaviva M, Stora G, Grossi V, Gilbert F (2007) Influence of bioturbation by the polychaete *Nereis diversicolor* on the structure of bacterial communities in oil contaminated coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 54:452-459
- Dodor DE, Hwang H-M, Ekunwe SIN (2004) Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 35:210-217
- Fenoll L, Rodriguez-Lopez J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, Tudela J (2002) Unification for the expression of the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 54:137-141
- Frouin H, Pellerin J, Fournier M, Pelletier E, Richard P, Pichaud N, Rouleau C, Garnerot F (2007) Physiological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on soft-shell clam *Mya arenaria*. *Aquatic Toxicology* 82:120-134
- Gagnaire B (2005) Etude des effets des polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Université de La Rochelle
- Gagnaire B, Gay M, Huvet A, Daniel J, Saulnier D, Renault T (2007) Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *In vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* 84:92-102
- Gopalakrishnan S, Thilagam H, Huang W-B, Wang K-J (2009) Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo(a)pyrene. *Chemosphere* 75:389-397
- Gouletquer P, Soletchnik P, Le Moine O, Razet D, Geairon P, Faury N (1998) Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Marennes-Oleron (France) Council Meeting of the International Council for the Exploration of the Sea
- Hagger JA, Depledge MH, Galloway TS (2005) Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin* 51:811-816
- Hannam ML, Bamber SD, Moody JA, Galloway TS, Jones MB (2009) Immune function in the Arctic Scallop, *Chlamys islandica*, following dispersed oil exposure. *Aquatic Toxicology* 92:187-194
- Hellio C, Bado-Nilles A, Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H (2007) Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish and Shellfish Immunology* 22:433-440
- Huggett R, Kimerle R, Mehrle Jr. P (1992) Biomarkers: biochemical, physiological and histological makers of anthropogenic stress, Vol. Lewis, Boca Raton
- Jenny MJ, Ringwood AH, Lacy ER, Lewitus AJ, Kempton JW, Gross PS, Warr GW, Chapman RW (2002) Potential indicators of stress response identified by Expressed Sequence Tag analysis of

- hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Biotechnology* 4:81-93
- Jeong W-G, Cho S-M (2007) Long-term effect of polycyclic aromatic hydrocarbon on physiological metabolisms of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 265:343-350
- Johnston SA (1981) Estuarine dredge and fill activities: A review of impacts. *Environmental Management* 5:427-440
- Le Moullac G (2008) Adaptation du métabolisme respiratoire de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Université de Caen Basse Normandie
- Lekunberri I, Calvo-Diaz A, Teira E, Moran X, Peters F, Nieto-Cid M, Espinoza-Gonzalez O, Gomes-Teixeira I, Gasol J (2010) Changes in bacterial activity and community composition caused by exposure to a simulated oil spill in microcosm and mesocosm experiments. *Aquatic Microbial Ecology* 59:169-183
- Livingstone D, Garcia Martinez P, Michel X, Ribera D, Winston G (1990) Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L. and other molluscs. *Functional Ecology* 4:415-424
- Luna-Acosta A, Bustamante P, Godefroy J, Fruitier-Arnaudin I, Thomas-Guyon H (2010a) Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed *in situ*. *Environmental Science and Pollution Research* 17:999-1008
- Luna-Acosta A, Rosenfeld E, Amari M, Fruitier-Arnaudin I, Bustamante P, Thomas-Guyon H (2010b) First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology* 28:719-726
- McHenry JG, Allen JA, Birkbeck TH (1986) Distribution of lysozyme-like activity in 30 bivalve species. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 85:581-584
- Michel J, Henry CB (1997) Oil uptake and depuration in oysters after use of dispersants in shallow water in El Salvador. *Spill Science and Technology Bulletin* 4:57-70
- Moore M, Pipe R, Farrar S, Thompson S, Donkin P (1987) Lysosomal and microsomal responses to oil-derived hydrocarbons in *Littorina littorea*. In: Capuzzo J, Kester D (eds) *Oceanic processes in marine pollution*, Vol 1. Robert E Krieger Publishing Company, Malabar, Florida, p 89-96
- Neumann N, Stafford J, Barreda D, Ainsworth A, Belosevic M (2001) Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental and Comparative Immunology* 25:807-825
- Orbea A, Ortiz-Zarragoitia M, Sole M, Porte C, Cajaraville MP (2002) Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology* 58:75-98
- Ordas M, Albaiges J, Bayona J, Ordas A, Figueras A (2007) Assessment of *in vivo* effects of the Prestige fuel oil spill on the Mediterranean mussel immune system. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52:200-206
- Paglia D, Valentine W (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 70:158-169
- Perez-Cadahia B, Laffon B, Pasaro E, Mendez J (2004) Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled Prestige crude oil. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 138:453-460
- Pipe R, Coles J, Carissan F, Ramanathan K (1999) Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 46:43-54
- Pomerantz S (1963) Separation, purification, and properties of two tyrosinases from hamster melanoma. *The Journal of Biological Chemistry* 238:2351-2357
- Richardson BJ, Mak E, De Luca-Abbott SB, Martin M, McClellan K, Lam PKS (2008) Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped

-
- mussels (*Perna viridis*): Do mussels "integrate" biomarker responses? *Marine Pollution Bulletin* 57:503-514
- Sami S, Faisal M, Huggett RJ (1993) Effects of laboratory exposure to sediments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons on the hemocytes of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research* 35:131-135
- Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B, Klenk D (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150:76-85
- Söderhäll K, Cerenius L (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10:23-28
- Sole M (2000) Assessment of the results of chemical analyses combined with the biological effects of organic pollution on mussels. *Trends in Analytical Chemistry* 19:1-9
- Soletchnik P, Lambert C, Costil K (2005) Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *Journal of Shellfish Research* 24:197-207
- Soudant P, Paillard C, Choquet G, Lambert C, Reid HI, Marhic A, Donaghy L, Birkbeck TH (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
- Tasman Spirit Oil Spill Impact Evaluation Committee (2003) Tasman Spirit Oil Spill Karachi, Pakistan: Assessment report. Karachi, Sindh Environmental Protection Agency.1-22
- Tran D, Ciret P, Ciutat A, Durrieu G, Massabuau JC (2003) Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: Application to cadmium. Wiley Periodicals, Inc., p 914-920
- Zar J (1984) *Biostatistical analysis*, Vol. Prentice-Hall, New Jersey

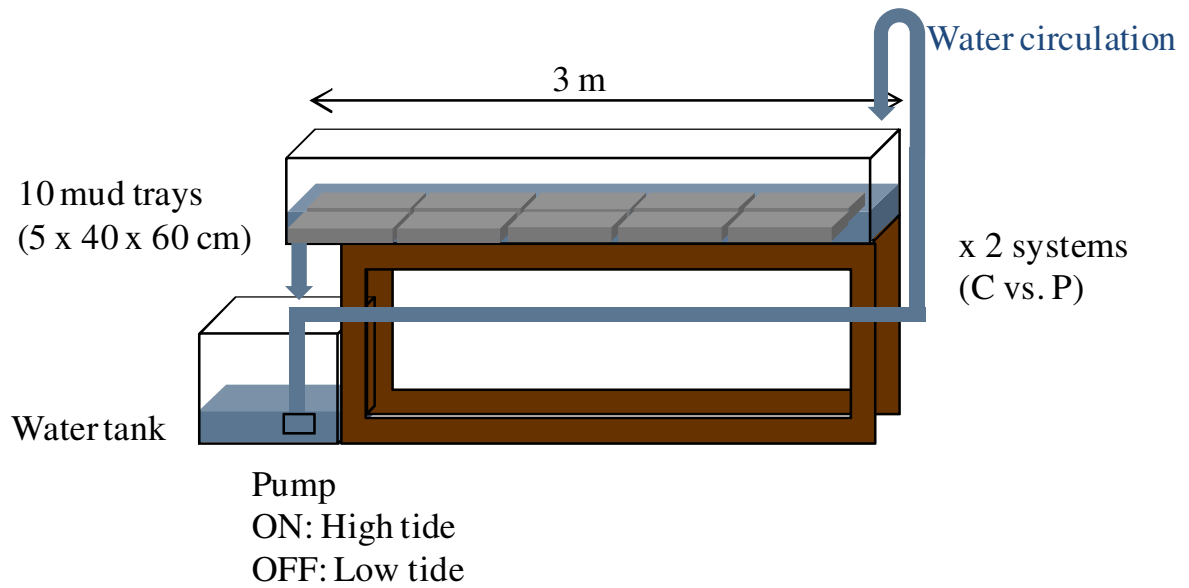


Figure 1 Experimental pollution device equipped with tidal cycles.

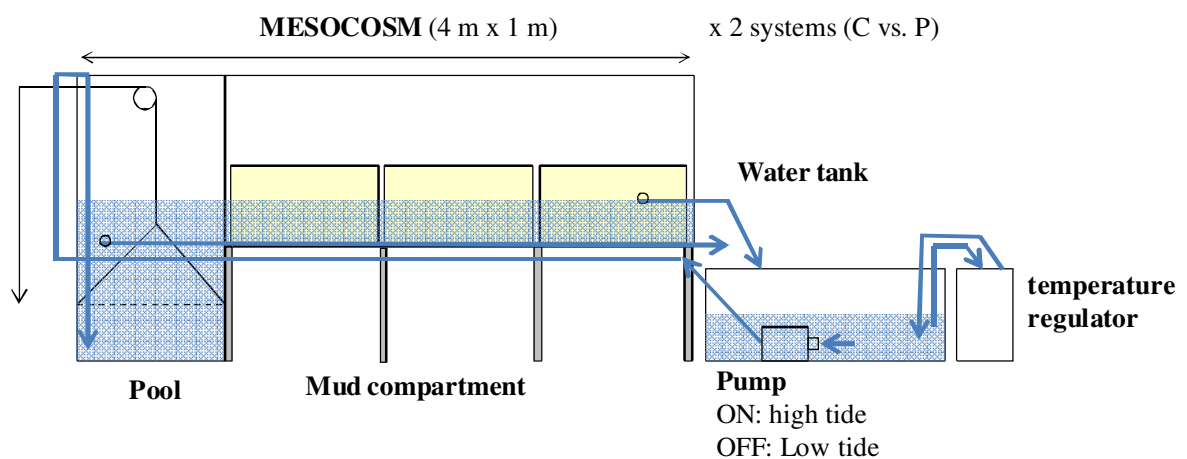


Figure 2 Mesocosm exposition device.

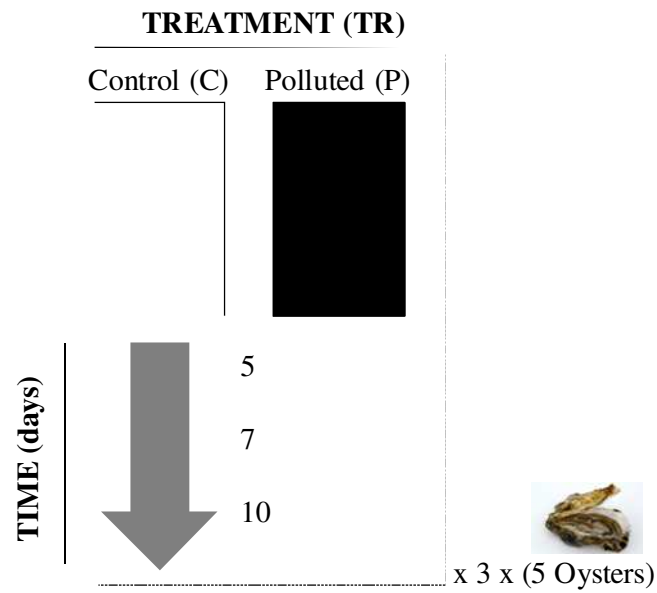


Figure 3 Experimental exposure protocol.

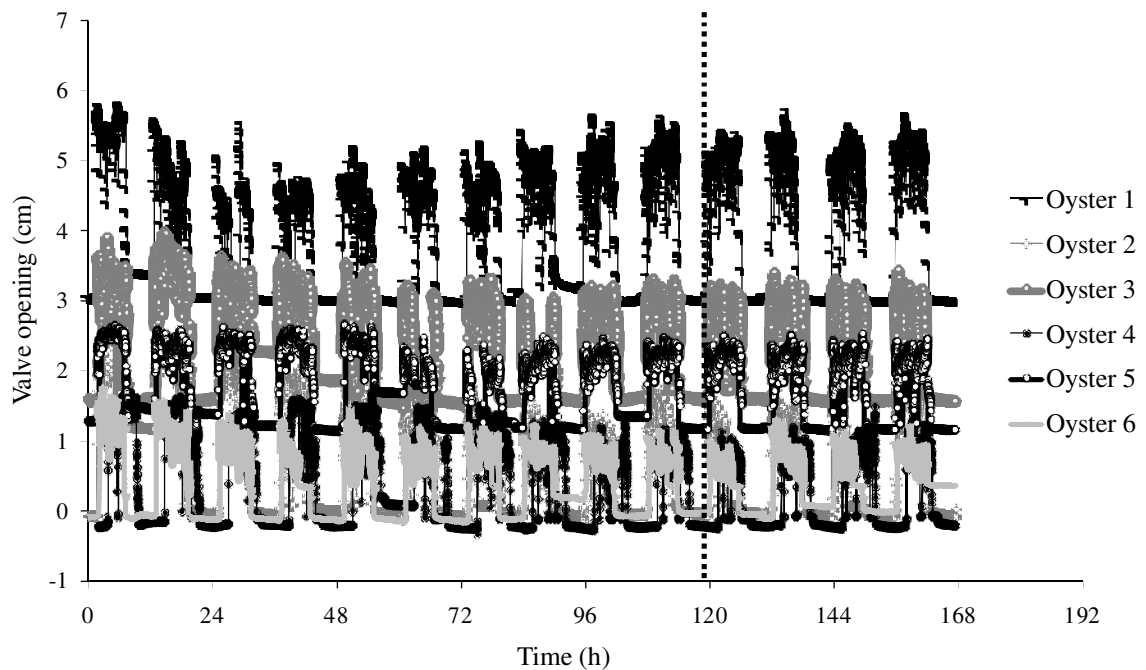


Figure 4 Valve mobility of *Crassostrea gigas* exposed to polluted mud sediment. The valvometre was installed at low tide inside the control mesocosm and after the 5th day of exposure (represented by the dotted line), the system was transferred into the polluted mesocosm for 2 days. Data was differentially distributed along the y axis for clarity of the results.

Table 1 Mean (\pm SD) of enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catecholase, laccase and lysozyme observed in the haemolymph of oysters according to different levels of treatment (TR: C: Control, P: Polluted) and TIME (5, 7, 10 days). Different letters indicate statistical difference among TIME. When means were not associated with letter, it means that they are not significantly different. Stars associated with > or < indicate statistical difference among TR at the same level of TIME.

Variables	Levels of TIME (d)	Levels of TR		
		C	P	
SOD	5	103.9 \pm 37.8	54.3 \pm 9.6	a,b
	7	44.7 \pm 32.7	114.4 \pm 34.3	b
	10	34.3 \pm 2.9	34.1 \pm 12.7	a
GPx	5	12.7 \pm 1.2	10.0 \pm 2.5	a
	7	15.4 \pm 2.8	15.9 \pm 1.2	a
	10	12.4 \pm 3.4	< 27.0 \pm 2.6	b*
Catecholase	5	54.9 \pm 5.8	51.1 \pm 7.3	a
	7	59.0 \pm 7.0	59.2 \pm 4.2	a
	10	42.8 \pm 6.0	< 87.1 \pm 4.7	b*
Laccase	5	1.3 \pm 0.2	0.9 \pm 0.3	a
	7	2.1 \pm 0.4	1.9 \pm 0.4	b,c
	10	1.6 \pm 0.2	2.2 \pm 0.2	c
Lysozyme	5	62.6 \pm 5.0	61.5 \pm 10.6	b
	7	51.1 \pm 16.7	48.4 \pm 5.5	a,b
	10	56.6 \pm 8.4	> 22.8 \pm 12.7	a*

Table 2 Results of multi-correlation tests that opposed the five studied variables (SOD, GPx, catecholase, laccase and lysozyme). Stars indicated significant correlation between two variables with the respect of Bonferroni corrected $\alpha' = 0.005$.

Variable	by Variable	Spearman Rho	Prob>•Rho•
GPx	SOD	-0.1146	0.6508
Laccase	SOD	-0.9150	0.4380
Laccase	GPx	0.8122	<.0001 *
Lysozyme	SOD	0.4345	0.0716
Lysozyme	GPx	-0.4221	0.0810
Lysozyme	Laccase	-0.4716	0.0428
Catecholase	SOD	0.0052	0.9838
Catecholase	GPx	0.8266	<.0001 *
Catecholase	Laccase	0.6966	0.0013 *
Catecholase	Lysozyme	-0.5067	0.0319

Annexe 8 : Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on the health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed *in situ*

Environ Sci Pollut Res (2010) 17:999–1008
DOI 10.1007/s11356-009-0287-1

RESEARCH ARTICLE

Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on the health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed *in situ*

Andrea Luna-Acosta • Paco Bustamante •
Joachim Godefroy • Ingrid Fruitier-Arnaudin •
Hélène Thomas-Guyon

Received: 29 July 2009 / Accepted: 23 December 2009 / Published online: 18 February 2010
© Springer-Verlag 2010

Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250, Université de La Rochelle – CNRS, 2, Rue Olympe de Gouges - 17000, La Rochelle, France

Corresponding author : A. Luna-Acosta
Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs)
UMR 6250, Université de La Rochelle - CNRS
2, Rue Olympe de Gouges - 17000, La Rochelle, France
email : aluna1508@yahoo.com
tel : +33 (0)5 46 45 87 91
fax : +33 (0)5 46 50 76 63

Abstract

Background, aim, and scope In this study, a suite of sublethal stress biomarkers were analysed in juveniles of the sentinel species, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, with a view to using them as pollution monitoring tools. The aim of this work was (1) to study baseline seasonal variations of biomarkers in different body compartments of *C. gigas* in the reference site and, after selecting biomarkers presenting no seasonal variations, (2) to compare responses of these biomarkers between contaminated and reference sites.

Materials and methods Juvenile oysters were transplanted from Bouin (France), a reference site, to three different sites in Marennes-Oleron Bay (France), located in another water body and next to different contamination sources. Animals were exposed *in situ* for 3 months in summer, autumn and winter. The following biomarkers were measured: superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) in gills and digestive gland, and lysozyme and phenoloxidase (PO) in plasma.

Results No significant seasonal variations for SOD in gills and digestive gland, GPx in gills, and PO in plasma were observed in the reference site. Significant differences in enzyme activity were observed between contaminated and reference sites for SOD in gills and digestive gland, and PO in plasma, depending on the body compartment, the season and/or the site.

Conclusions In conclusion, these data suggest the potential application of these biomarkers in *C. gigas* to provide ecologically relevant information and therefore, to be used as biomarkers in coastal pollution monitoring.

Keywords: Biomarkers • Pollution • Monitoring • Antioxidant enzymes • Immune defences • *Crassostrea gigas*

1 Background, aim and scope

Sessile and filter-feeder organisms inhabiting coastal waters and estuaries, such as the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1753), are constantly in contact with various chemical products. Therefore, networks such as the National Monitoring Network (RNO) in France use this organism as a sentinel species to assess the presence of pollutants on coasts and estuaries. However, massive summer mortalities of this ecologically and economically important organism, and particularly of juvenile populations, have become a widespread concern in the world in recent decays (Cheney et al. 2000; Garnier et al. 2007; Perdue et al. 1981). Marennes-Oleron Bay is the first production site of this species in France (Soletchnik et al. 1999), but this area is also subjected to many recurring pollution by heavy metals, pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), brought mainly by the Charente River and to a less extent by the Sèvre and the Gironde rivers (Miramand et al. 2003; Munaron 2004; Munaron et al. 2006). Nevertheless, environmental stress from pollutants seems to be an important determining factor signalled by the occurrence of, or by the increase of diseases (Lacoste et al. 2001).

To cope with this type of challenges, bivalve molluscs possess the two types of innate responses: cellular, i.e., phagocytosis and encapsulation, and humoral, i.e., lectines, cytokines, heat shock proteins, nitric oxide synthases, proteases, antimicrobial peptides, phenoloxidases (PO) and hydrolytic enzymes such as lysozymes (Tryphonas et al. 2005). Moreover, during phagocytosis, reactive oxygen species (ROS), such as O_2^- and H_2O_2 , play an important role in protection against pathogens. The content of ROS in the organism is regulated by antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) (Neumann et al. 2001). These antioxidant enzyme activities may be modulated by the presence of contaminants (Cavaletto et al. 2002; Cheung et al. 2004; Verlecar et al. 2007). Other immune parameters such as lysozyme and PO activities may also be modulated by contaminants. High concentrations of zinc (Zn) have shown to inhibit lysozyme activity in the sea star (*Marthasterias glacialis*) mucus (Stabili and Pagliara 2009). In addition to that, a 48-hours exposure of a soluble fraction of heavy fuel oil has shown to inhibit PO activity in plasma of *C. gigas* (Bado-Nilles et al. 2008), and the presence of trichlorfon has shown to inhibit PO activity in the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*, Chang et al. 2006). Biomarkers are defined as measurements on body fluids, cells, tissues, or on whole animals that indicate the presence of contaminants in biochemical, cellular, physiological, behavioural or energetic terms (Bodin et al. 2004; Livingstone 2003; Magni et al. 2006; Ross et al. 2002). Therefore, these immune parameters may be used as effect biomarkers, i.e., to detect sensitive signals for deleterious effects of environmental contamination (Bernier et al. 1995; Luster et al. 1989). Some effect biomarkers, such as antioxidant enzymes, may also be used as exposure biomarkers, i.e., to detect if the organism has been exposed to pollutants (Winston and Di Giulio 1991). An increasing use of both types of biomarkers has appeared in recent years in programs such as the North Sea Task Force Monitoring Master Plan and the NOAA's National Status and Trends Program (Cajaraville et al. 2000).

Laboratory studies may help to identify biomarkers of interest. However, a lack of validation may occur when using these biomarkers in the field with organisms from contaminated and reference sites, e.g., immune parameters may vary depending on the season (Auffret and Oubella 1994; Oliver and Fisher 1995) and/or biomarker responses may vary depending on the body compartment of the organism that is analyzed (Amiard et al. 2006; Geffard et al. 2001). Therefore, it is important to know baseline seasonal variations of biomarkers, especially when they are used to monitor the presence and/or effect of contaminants during *in situ* studies. The aims of the present study were (1) to assess baseline seasonal variations of different biomarkers in different body compartments of *C. gigas* collected from a reference site and, after selecting biomarkers presenting no seasonal variations, (2) to compare responses of these biomarkers between contaminated and reference sites. To this end, juvenile Pacific oysters *C. gigas* were transplanted from Bouin (France), a reference site located far from pollution sources, to three different sites in Marennes-Oleron Bay, located in another water body and next to different contamination sources, for 3 months in summer, autumn and winter. Juveniles were chosen among other developmental stages since they have shown to be more sensitive to summer mortality events (Perdue et al 1981). Biomarker analyses were carried out by measuring SOD and GPx levels in gills and digestive gland and lysozyme and PO levels in plasma.

2 Materials and methods

2.1 Study area and transplant design

Juvenile Pacific oysters *C. gigas* (3-4 cm in height) were purchased from the oyster hatchery France Naissain, located at Bouin in Vendée, France (46° 58' 28" North, 2° 00' 02" West), considered as a reference site (Fig. 1a; Geffard et al. 2002). All animals were issued from the same cohort in order to reduce genotype variability. Juveniles were transplanted from Bouin to three "contaminated" sites that were far from the reference site, in the Marennes-Oleron Bay, C1, C2 and C3, i.e., C1: Mus du Loup (45° 46' 10" North, 1° 08' 30" West), mildly influenced by the Seudre River; C2: Boyard (45° 58' 0" North, 1° 15' 0" West), mildly influenced by the Gironde and the Charente rivers; C3: Les Palles (45° 58' 0" North, 1° 08' 0"), highly influenced by the Charente River (Fig. 1b). Three months after transplantation, nine oysters from each site were collected and were processed immediately after their arrival in the laboratory. Experiments were carried out in summer, autumn and winter 2008.

2.2 Sample procedure

Pooled gills, digestive glands and plasma of three oysters were used for each replicate sample, and three replicates were prepared per season and per site. After opening the oyster shells by cutting off the adductor muscle, a quantity of haemolymph (~ 0.3-0.5 mL for the three oysters) was withdrawn and centrifuged (260xg, 10 min, 4°C) to separate the cellular fraction from the plasma. Gills and digestive gland were removed from oysters. For a pool of three oysters, about 0.7 ± 0.1 g of gills and 4.2 ± 1.2 g of digestive gland were homogenized at 4°C in 0.1 M Tris HCl buffer pH 7.0 (0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂, 10 mM

CaCl₂; 0.5 ml of buffer g⁻¹ of fresh weight for the gills and 1 ml g⁻¹ of fresh weight for the digestive gland), using an Ultra Turrax (T25 basic, IKA-WERKE) and a Thomas-Potter homogenizer (IKA-Labortechnik RW 20.n, size 0.13-0.18 mm, BB). The homogenate was centrifuged at 10,000xg for 10 min at 4°C. The resulting supernatant was collected for enzymatic studies.

2.3 Biochemical analysis

Superoxide dismutase assay • SOD was determined by an indirect method (Therond et al. 1996), based on competition of SOD with iodonitrotetrazolium (INT) for dismutation of superoxide anion (O₂⁻). In the presence of O₂⁻, INT is reduced into a red formazan dye that can be measured at 505 nm at 25°C (kit Ransod SD 125, Randox, France). One unit of SOD is defined as the amount of enzyme that promotes a 50% decrease in the rate of INT reduction.

Glutathione peroxidase assay • GPx activity was determined according to the method of Paglia and Valentine (1967). In the presence of glutathione reductase and substrates (i.e., reduced glutathione and cumene hydroperoxide), the decrease of absorbance at 340 nm is proportional to the reduction of the oxidised glutathione by NADPH, H⁺ (Kit Ransel RS 504, Randox, France). One unit of GPx oxidises 1 µmol of NADPH ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) per minute.

Lysozyme assay • Lysozyme assay was done in triplicate for each sample and compared against hen egg white lysozyme standards (0.4-40 µg ml⁻¹), in the presence of *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, France). One unit of lysozyme corresponds to the amount of enzyme that diminishes absorbance at 450 nm of 0.001 per minute at pH 7.0, at 25°C (Soudant et al. 2004).

Phenoloxidase assay • PO levels in plasma have been reported to be higher than PO levels in haemocytes of *C. gigas* (Hellio et al. 2007). Therefore, PO assay was measured in plasma and was carried out in triplicate for each sample in the presence of 100 mM dopamine and 0.1 M Tris HCl buffer, pH 7.0 (0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂; Sigma-Aldrich, France). PO activity was followed by monitoring the increase of absorbance at 490 nm for 4 h. Nonenzymatic oxidation by the substrate was followed in wells without plasma and subtracted to oxidation of the substrate with plasma. One unit of PO specific activity corresponds to the amount of enzyme that catalyzes the production of 1 µmole of dopachrome ($\epsilon_{\text{Dopachrome}} = 3,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) per minute (Pomerantz 1963, Fenoll et al. 2002).

Protein assay • All activities were expressed in relation to protein concentration measured according to the Lowry method with slight modifications, by using bicinchoninic acid and copper sulphate 4% (Smith et al. 1985). Serum albumin was used as standard (Sigma-Aldrich, France).

Statistical analysis • All results were expressed as mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was carried out with SYSTAT 11.0 software. Differences among seasons were checked for the reference site. For the same season, biomarkers responses were compared between contaminated and reference sites. Data were tested for normal distribution (Shapiro test) and homogeneity of variances (Bartlett test). Student's *t* test was performed to analyze results. Kruskal-Wallis nonparametric test, followed by Dunn's

post hoc test, was performed when data were not normally distributed or when they exhibited heterogeneous variances (Zar, 1984). Statistical significance was defined as being at the level of $p < 0.05$ or $p < 0.01$.

3 Results

3.1 Seasonal variations of biomarkers in the reference site

The results of SOD and GPx levels in gills and in digestive gland measured in oysters collected from the reference site in summer, autumn, and winter are summarized in Fig. 2. There were no statistically relevant seasonal differences ($p > 0.05$) in SOD levels in gills (Fig. 2a) and in digestive gland (Fig. 2b). However, GPx baseline seasonal variations differed between gills and digestive gland: while no significant differences ($p > 0.05$) were observed in GPx levels in gills in summer, autumn and winter (24.83 ± 7.44 , 16.58 ± 4.38 and 16.03 ± 8.90 U GPx mg^{-1} protein, respectively; Fig. 2c), significant differences ($p < 0.01$) were observed in the digestive gland (Fig. 2d). Indeed, GPx levels in the digestive gland in summer were about twofold lower than GPx levels in autumn and winter (38.29 ± 8.68 , 64.55 ± 11.15 and 77.51 ± 5.37 U GPx mg^{-1} protein, respectively; Fig. 2d).

Studies on lysozyme levels were carried out in plasma of *C. gigas*. Significant differences in plasmatic lysozyme levels ($p < 0.01$) were observed in oysters collected at the three different seasons (Fig. 3a). Lowest lysozyme levels were observed in winter, when compared to summer and autumn (42.90 ± 4.07 , 51.94 ± 3.27 and 64.44 ± 3.93 U lysozyme mg^{-1} protein, respectively). No statistically relevant seasonal differences ($p > 0.05$) were observed in plasmatic PO levels, i.e., in summer, autumn and winter (53.90 ± 9.77 , 51.81 ± 9.32 and 52.45 ± 7.99 U PO mg^{-1} protein, respectively; Fig. 3b). Therefore, since no significant seasonal differences were observed in SOD in gills and digestive gland, GPx in gills, and PO in plasma, these biomarkers were selected for further studies.

3.2 Biomarker responses in contaminated sites

The results of SOD levels in gills and in digestive gland, GPx levels in gills and PO levels in plasma collected from the three contaminated sites, i.e., C1 (Mus du Loup), C2 (Boyard), and C3 (Les Palles) and from the reference site, R (Bouin), are summarized in Fig. 4. In the present comparison, responses of biomarkers in C3 were measured only in summer and winter.

There were statistically significant differences in SOD levels in gills for the three contaminated sites C1, C2 and C3 in summer (Fig. 4a). Indeed, SOD levels in gills were lower in contaminated sites as compared to the reference site. In autumn, no significant differences were observed. In winter, SOD contents in gills were lower only in C2 when compared to the reference site.

In the digestive gland, statistically significant differences in SOD levels were observed depending on the season and/or the site (Fig. 4b). Indeed, while higher SOD contents were observed in C1 and C3 in summer, no significant differences were observed in autumn for C1 and C2. In winter, higher contents of SOD were observed in C1 and C2, and lower contents were observed in C3.

The results of GPx levels in gills in contaminated and reference sites are summarized in Fig. 4c. No significant differences were observed in summer for C1, C2, C3, in autumn for C1, and in winter for C3. Low GPx levels were measured in autumn in C2 and winter in C3, and high GPx levels were measured in winter in C1.

Results on plasmatic PO levels revealed significantly lower levels in summer in C1, C2 and C3 and in autumn in C1 and C2, but higher levels in winter in C1 and C2, when compared to the reference site (Fig. 4d).

4 Discussion

Specific biomarkers are often used for studies in laboratory-controlled conditions (e.g., Boutet et al. 2002, Guilhermino et al. 1996). However, in the field, environmental conditions may modulate responses of biomarkers (Matsunaga et al. 1989; Monserrat et al. 2007; Neumann and Peter 1987; Sepcic et al. 1998). Moreover, compensatory adaptive mechanisms between different biomarkers may occur as well (Regoli and Principato 1995) and biomarker responses may differ depending on the body compartment of the organism that is analyzed (Amiard et al. 2006; Geffard et al. 2001). In the green-lipped mussel, *Perna viridis*, seasonal SOD variations observed in gills and digestive gland were likely to be due, in part, to variations of temperature in the water column (Verlecar et al. 2008). In the case of the present study, no seasonal variations were observed in SOD in gills and digestive gland in the reference site. This suggests that antioxidant modulations differ between species and that is necessary to study baseline levels on the organism of interest before comparing biomarker responses between contaminated and reference sites.

In the present study, significant seasonal differences were observed in GPx levels in digestive gland in the reference site, with lower levels observed in summer. These results were in agreement with other studies that revealed similar seasonal variations of GPx in *P. viridis* from Arabian Sea (Verlecar et al. 2008). Winter is a period where oxidative stress is known to be high in bivalves (Manduzio et al. 2004). Therefore, high GPx activities in the digestive gland in autumn and winter may be a consequence of high oxidative stress. It is important to notice that no seasonal variations were observed in GPx levels in gills, making studies on pollution monitoring more interesting in this body compartment. Moreover, these results are in agreement with Manduzio et al. (2004) who suggested that biomonitoring studies dealing with oxidative stress in the blue mussel, *Mytilus edulis*, should preferentially be carried out in the gills rather than in the digestive gland.

In the present study, significant seasonal differences were observed in plasmatic lysozyme activity. Results revealed lower levels in winter and summer. Low lysozyme levels in summer were in agreement with results in other molluscan and nonmolluscan species (Chu et al. 1995; Hutchinson and Manning 1996). However, in the present study, low levels were also observed in winter. Even if generally low lysozyme levels are associated to the reproductive cycle of oysters in summer, low levels have also been found in the flat oyster *Ostrea edulis* in winter (Cronin et al. 2001). This suggests that low lysozyme levels are not necessarily associated to the reproductive cycle of oysters, which starts at the end of spring (Fabioux et al. 2005). No significant seasonal differences were observed in PO

levels in plasma. However, seasonal variations of PO activities have been reported in different species (Ferrer et al. 1989; Hauton et al. 1997; Travers et al. 2008). These seasonal variations have been attributed to bacterial population contents in the water column or to the reproductive state of the organism. Ferrer et al. (1989) observed seasonal variations in PO activity after treating with trypsin but not in endogenously active PO in the spiny lobster *Panulirus argus*. Therefore, results of the present study are in agreement with Ferrer et al. (1989) since, in the present study, only endogenously active PO levels were measured. No significant seasonal variations were observed in SOD in gills and digestive gland, GPx in gills, and PO in plasma in the reference site. Interestingly, these results suggest that differences in water temperature (18.39 ± 1.73 in summer, 15.33 ± 2.89 in autumn and 8.83 ± 2.18 in winter; Table 1), in age (12 months in summer, 15 months in autumn, 18 months in winter) and in condition index (31.85 ± 5.43 in summer, 23.90 ± 1.42 in autumn and 17.15 ± 1.42 in winter; Table 1) between seasons do not modulate responses of these biomarkers. Consequently, SOD in gills and digestive gland, GPx in gills, and PO in plasma were measured in oysters transplanted to different contaminated sites in Marennes-Oleron Bay.

Comparisons of biomarker responses between reference and contaminated sites revealed that (1) SOD levels in gills were generally lower, (2) SOD levels in digestive gland were generally higher, (3) GPx levels in gills were not modulated in summer but were lower in autumn in one contaminated site and lower or higher in summer depending on the contaminated site, and (4) PO levels were generally lower in summer and autumn and higher in winter. Differences in pollutant contents between contaminated and reference sites could explain differences observed in biomarker responses, e.g., in the case of GPx in gills or SOD in the digestive gland, as it has been shown by other studies carried out in different contaminated sites (Bodin et al. 2004; Valdez Domingos et al. 2007). Marennes-Oleron Bay is an area subjected to many recurring pollution, brought mainly by the Charente River (i.e., contaminated site C3) and to a less extent by the Gironde (i.e., C2) and the Seudre rivers (i.e., C1). The recrudescence use of herbicides in agriculture implies the transfer towards the aquatic environment of new pollutants in estuarine areas (Munaron 2004; Munaron et al. 2006). In 2001, the Charente river discharged approximately 1,360 kg of herbicides and, in 2002, about 510 kg (Munaron 2004). For most herbicides that were studied, summer (July, August and September) corresponded to the period when quantities of herbicides provided by the Charente river were the lowest, i.e., between 12 and 30 kg of herbicides per month and the peak concentrations occurred especially at times when treatments were applied within the watershed, e.g., in May 2001, 400 kg of herbicides were carried down to the estuary in 1 month. Peak concentrations from 0.1 to $1 \mu\text{g L}^{-1}$ have been reported for herbicides such as atrazine, isoproturon, diuron, and glyphosate in the Marennes-Oleron Bay (Burgeot et al. 2007). Moreover, industrial releases bring many heavy metals in these same estuarine areas (Miramand et al. 2003). Indeed, increasing levels of heavy metals [silver (Ag), cadmium (Cd), chromium (Cr), copper (Cu), nickel (Ni), vanadium (V), and zinc (Zn)], have been reported in Marennes-Oleron Bay (Miramand et al. 2003). Similarly, these authors reported high PAHs contents in sediments and organisms from the Marennes-Oleron Bay. Some pollutant contents have been reported in sites chosen for the present study: high

Cd, Hg, dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and metabolites, lindane and fluoranthene contents have been detected in C1, high Cd, Hg and lindane contents have been detected in C2, and high Ag, Cd, Hg, Zn, contents have been detected in C3 (Table 1). These pollutants are, therefore, likely to strongly influence the biomarkers levels in oyster tissues and fluids.

Among all biomarkers assessed in the reference site, only SOD levels in gills and digestive gland, GPx levels in gills and PO levels in plasma displayed low variations between seasons. Interestingly, some of these biomarkers were modulated depending on the season and this, for the three contaminated sites. Therefore, modulations on biomarker responses could be due to (1) abiotic or biotic factors in this area such as temperature, salinity, pH or food supply (Kheissiba et al. 2005; Kirchin et al. 1992; Lima et al. 2007; Prevodnik et al. 2007; Verlecar et al. 2007), (2) modulations of contaminant contents through seasons (Niyogi et al. 2001), and/or (3) an additive effect of temperature variations and contaminant contents in these areas. Indeed, Ringwood et al. (2002) reported a correlation between lysosomal destabilization in deployed oysters *Crassostrea virginica* and tissue metal concentrations. The authors suggested that adverse effects observed in winter could be due to seasonal differences in physico-chemical factors, such as reduced levels of acid volatile sulfides, which could increase the bioavailability of metals during winter. In the present study, differences in condition index were observed depending on the season and the site. Even if differences observed in the reference site suggest that this parameter do not induce modulations of the biomarkers that were selected for the present study, differences of condition index were observed between the reference and the contaminated sites. Indeed, when comparing condition index between reference and contaminated sites, this parameter was higher in summer in the three contaminated sites, higher or lower in autumn depending on the site, and higher in winter in one contaminated site (Table 1). These differences may be due to differences in food supply or environmental stressors such as changes in temperature. However, temperature data do not reveal differences between sites and chlorophyll *a* content in the water column is not always correlated with condition index of oysters (Table 1). Hence, differences in condition index may be due to differences in food composition between sites. However, while results suggest a negative correlation between condition index and GPx levels in gills and PO levels in plasma, no correlation is observed in autumn and winter. Moreover, the presence of pollutants may also induce differences in condition index. Lannig et al. (2006) reported no significant change in condition, survival rate, and lipid peroxidation in oysters, *C. virginica*, exposed to elevated temperature. However, in oysters exposed to both temperature and Cd stresses, high mortality, low condition index, and elevated lipid peroxidation were observed, implying a synergism between elevated temperatures and Cd stress on their energy metabolism. In the Marennes-Oleron area, the period when herbicides are sprayed on the crops, combined to rainfall events, coincides with the oyster-breeding season, and these events have been suggested to influence summer oyster mortalities (Munaron 2004; Munaron et al. 2006). Therefore, more special attention should be carried out between condition index, food composition, pollutant contents, and response of biomarkers.

In conclusion, response biomarkers were modulated depending on (1) the oyster body compartment, (2) the season, and (3) the site. Therefore, results of this work suggest that SOD in gills and digestive gland, GPx in gills, and PO levels in plasma could be biomarkers of interest to assess the impact of pollutants on health status in juveniles of *C. gigas*. Further similar studies should be done on these biomarkers in other contaminated sites (e.g., Valdez Domingos et al. 2007). Moreover, similar studies should be carried out with other biomarkers in this sentinel species in order to establish baseline levels of different biomarkers of interest for coastal pollution monitoring studies.

Acknowledgments

This study was supported by a Ph.D. grant from the Conseil Général de la Charente-Maritime. The Région Poitou-Charentes, the Région Aquitaine, the Conseil Général de la Charente-Maritime, the Conseil Général de la Gironde, the Agence de l'Eau Adour-Garonne are acknowledged for financial support for the project "Défi Cadmium". The authors wish to thank M. Baudrimont and D. Fichet for supporting this study through the "Défi Cadmium" project. The authors also acknowledge C. Trichet and D. Vilday for their assistance during the study and the Ifremer networks RNO and Razlec, the "Site Ifremer consacré à l'environnement littoral", and especially O. Le Moine, P. Soletchnik, S. Guesdon, P-G. Sauriau, P. Miramand, and T. Guyot for data and references from Marennes-Oleron Bay. The authors thank F. Healy (Centre Inter-Pôles d'Enseignement des Langues, Université La Rochelle) for critical reading of this document.

References

- Amiard J, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow P (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Tox* 76:160-202
- Auffret M, Oubella R (1994) Cytometric parameters of bivalve molluscs: effect of environmental factors. In: Stolen J, Fletcher T (eds) *Modulators of fish immune responses*, Vol 1. SOS Publications, Fair Haven, CT, pp 23-32
- Bado-Nilles A, Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Le Floch S, Renault T (2008) Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicol In Vitro* 22:1610-1617
- Bernier J, Brousseau P, Krzystyniak K, Tryphonas H, Fournier M (1995) Immunotoxicity of heavy metals in relation to Great Lakes. *Env Health Pers* 103:23-24
- Bodin N, Burgeot T, Stanisiere J, Bocquene G, Menard D, Minier C, Boutet I, Amat A, Cherel Y, Budzinski H (2004) Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comp Biochem Physiol* 138C:411-427
- Boutet I, Tanguy A, Auffret M, Riso R, Moraga D (2002) Immunochemical quantification of metallothioneins in marine molluscs: Characterization of a metal exposure bioindicator. *Environ Toxicol Chem* 21:1009-1014
- Burgeot T, Gagnaire B, Renault T, Haure J, Moraga D, David E, Boutet I, Sauriau PG, Malet N, Bouchet V, Le Roux A, Lapègue S, Bouilly K, Le Moullac G, Arzul G, Knoery J, Quiniou F, Bacher C, Soletchnik P (2007) Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In: Samain JF, McCombie H (ed) *The Morest Project*, Ifremer/Quæ, Versailles, France, pp 107–151

- Cajaraville M, Bebianno M, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *Sci Total Environ* 247:295-311
- Cavaletto M, Ghezzi A, Burlando B, Evangelisti V, Ceratto N, Viarengo A (2002) Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Biochem Physiol* 131C:447-455
- Chang C, Lee P, Liu C, Cheng W (2006) Trichlorfon, an organophosphorus insecticide, depresses the immune responses and resistance to *Lactococcus garvieae* of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immun* 20:574-585
- Cheney D, Macdonald B, Elston R (2000) Summer mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J Shellfish Res* 19:353-359
- Cheung C, Siu W, Richardson B, De Luca-Abbott S, Lam P (2004) Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Env Poll* 128:393-403
- Chu F, Volety A, La Peyre J (1995) Annual variation of hemolymph components and *Perkinsus marinus* infection in oysters sampled from Deep Water Shoal, James River, Virginia. *J Shellfish Res* 14:263
- Cronin M, Culoty S, Mulcahy M (2001) Lysozyme activity and protein concentration in the haemolymph of the flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Fish Shellfish Immun* 11:611-622
- Fabioux C, Huvet A, Le Souchu P, Le Pennec M, Pouvreau S (2005) Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250: 458-470
- Fenoll LG, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, Tudela J (2002) Unification for the expression of the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *IUBMB Life* 54:137-41
- Ferrer O, Koburger E, Simpson B, Gleeson R, Marshall M (1989) Phenoloxidase levels in Florida spiny lobster (*Panulirus argus*): relationship to season and molting stage. *Comp Biochem Physiol* 93B:595-599
- Garnier M, Labreuche I, Garcia C, Robert M, Nicolas J (2007) Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb Ecol* 53:187-196
- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard J, Mouneyrac C (2001) Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site. *Biomarkers* 6:91-107
- Geffard A, Amiard J, Amiard-Triquet C (2002) Kinetics of metal elimination in oysters from a contaminated estuary. *Comp Biochem Physiol* 131C:281-293
- Guilhermino L, Lopes M, Carvalho A, Soares M (1996) Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with *Daphnia Magna*. *Chemosphere* 32:727-738
- Hauton C, Hawkins L, Williams J (1997) *In situ* variability in phenoloxidase activity in the shore crab, *Carcinus maenas* (L.). *Comp Biochem Physiol* 117B:267-271
- Hellio C, Bado-Nilles A, Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H (2007) Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish Shellfish Immun* 22:433-440
- Hutchinson T, Manning M (1996) Seasonal trends in serum lysozyme activity and total protein concentration in dab (*Limanda limanda* L.) sampled from Lyme Bay, UK. *Fish Shellfish Immun* 6:473-482
- Khessiba A, Romeo M, Aissa P (2005) Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Env Poll* 133:275-281
- Kirchin M, Wiseman A, Livingstone D (1992) Seasonal and sex variation in the mixed-function oxygenase system of digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Comp Biochem Physiol* 101C:81-91
- Lacoste A, Jalabert F, Malham S, Cueff A, Poulet S (2001) Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *App Env Micro* 67:2304-2309

- Lannig G, Flores J, Sokolova I (2006) Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduced temperature tolerance in oysters. *Aquat Tox* 79:278-287
- Lima I, Moreira S, Osten J, Soares A, Guilhermino L (2007) Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. *Chemosphere* 66:1230-1242
- Livingstone D (2003) Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J Chem Tech Biotech* 57:195-211
- Lobel P, Wright D (1982) Relationship between body zinc concentration and allometric growth measurements in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 66:145-150
- Luster M, Ackermann M, Germolec D, Rosenthal G (1989) Perturbations of the immune system by xenobiotics. *Env Health Pers* 81:157-162
- Magni P, De Falco G, Falugi C, Franzoni M, Monteverde M, Perrone E, Sgro M, Bolognesi C (2006) Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). *Env Poll* 142:65-72
- Manduzio H, Monsinjon T, Galap C, Leboulenger F, Rocher B (2004) Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: Major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat Tox* 70:83-93
- Matsunaga S, Moore R, Niemczura W, Carmichael W (1989) Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J Am Chem Soc* 111:8021-8023
- Miramand P, Guyot T, Pigeot J (2003) Sources et impacts potentiels des micropolluants chimiques sur un écosystème littoral exploité: L'exemple des côtes de Charente-Maritime. *J Phy IV (Proceedings)* 108:3-6
- Monserrat J, Martinez P, Geracitano L, Amado L, Martins C, Pinho G, Chaves I, Cravo M, Lima J, Bianchini A (2007) Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp Biochem Physiol* 146C:221-234
- Munaron D (2004) Etude des apports en herbicides et nutriments par la Charente: Modélisation de la dispersion de l'atrazine dans le bassin de Marennes-Oléron. PhD Thesis. Université Pierre et Marie Curie Paris VI
- Munaron D, Dubernet J, Delmas F, Stanisiere J, Scribe, P (2006) Assessment of the quantities of herbicides and nutrients brought down by the river Charente to the coast and modelling of the dispersion of atrazine in the Marennes-Oleron bay. *Cah Biol Mar* 47:85-92
- Neumann N, Stafford J, Barreda D, Ainsworth A, Belosevic M (2001) Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev Comp Immunol* 77:339-347
- Neumann R, Peter H (1987) Insecticidal organophosphates: Nature made them first. *Cell Mol Life Sci* 43:1235-1237
- Niyogi S, Biswas S, Sarker S, Datta G (2001) Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary seasonality and its consequences. *Sci Total Environ* 281:237-246
- Oliver L, Fisher W (1995) Comparative form and function of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes from Chesapeake Bay (Virginia) and Apalachicola Bay (Florida). *Dis Aquat Org* 22:217-225
- Paglia D, Valentine W (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158-169
- Perdue J, Beattie J, Chew K (1981) Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the Washington State. *J Shellfish Res* 1:9-16
- Pomerantz S (1963) Separation, purification, and properties of two tyrosinases from hamster melanoma. *J Biol Chem* 238:2351-2357
- Prevodnik A, Gardeström J, Lilja K, Elfving T, McDonagh B, Petrovic N, Tedengren M, Sheehan D, Bollner T (2007) Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* L.: Evidence for variation along a natural salinity gradient of the Baltic Sea. *Aquat Tox* 82:63-71

- Regoli F, Principato G (1995) Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: Implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat Tox* 31:143-164
- Ringwood A, Hogue J, Keppler C (2002) Seasonal variation in lysosomal destabilization in oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar Env Res* 54:793-797
- Ross K, Cooper N, Bidwell J, Elder J (2002) Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: A comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar Poll Bull* 44:671-679
- Sepeck K, Marcel V, Klæbe A, Turk T, Suput D, Fournier D (1998) Inhibition of acetylcholinesterase by an alkylpyridinium polymer from the marine sponge, *Reniera sarai*. *Biochim Biophys Acta* 1387:217-225
- Smith P, Khron R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provanzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B, Klenk D (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85
- Soletchnik, P, Le Moine, O, Faury, N, Razet, D, Geairon, P, Gouletquer, P (1999) Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron: Etude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d'informations géographiques (SIG). *Aquat Living Resour* 12 :131-143
- Soudant P, Paillard C, Choquet G, Lambert C, Reid H, Marhic A, Donaghy L, Birbeck T (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
- Stabili L, Pagliara P (2009) Effect of zinc on lysozyme-like activity of the seastar *Marthasterias glacialis* (*Echinodermata, Asteroidea*) mucus. *J Invert Path* 100:189-192
- Therond P, Gerbaud P, Dimon S, Anderson W, Evain-Brion, Raynaud F (1996) Antioxidant enzymes in psoriatic fibroblasts and erythrocytes. *J Invest Derm* 106:1325-1331
- Travers M, Le Goïc N, Huchette S, Koken M, Paillard C (2008) Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immun* 25:800-808
- Tryphonas H, Fournier M, Blakley B, Smits J, Brousseau P (2005) Investigative Immunotoxicology. Informa HealthCare, London
- Valdez Domingos F, Azevedo M, Silva M, Randi M, Freire C, Silva de Assis H, Oliveira Ribeiro C (2007) Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. *Env Res* 105:350-363
- Verlecar X, Jena K, Chainy G (2007) Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chemico-Biol Interactions* 167:219-226
- Verlecar X, Jena K, Chainy G (2008) Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuarine Coastal Shelf Sci* 76:745-752
- Winston G, Di Giulio R (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Tox* 19:137-161
- Zar J (1984) Biostatistical analysis. Prentice-Hall, New Jersey

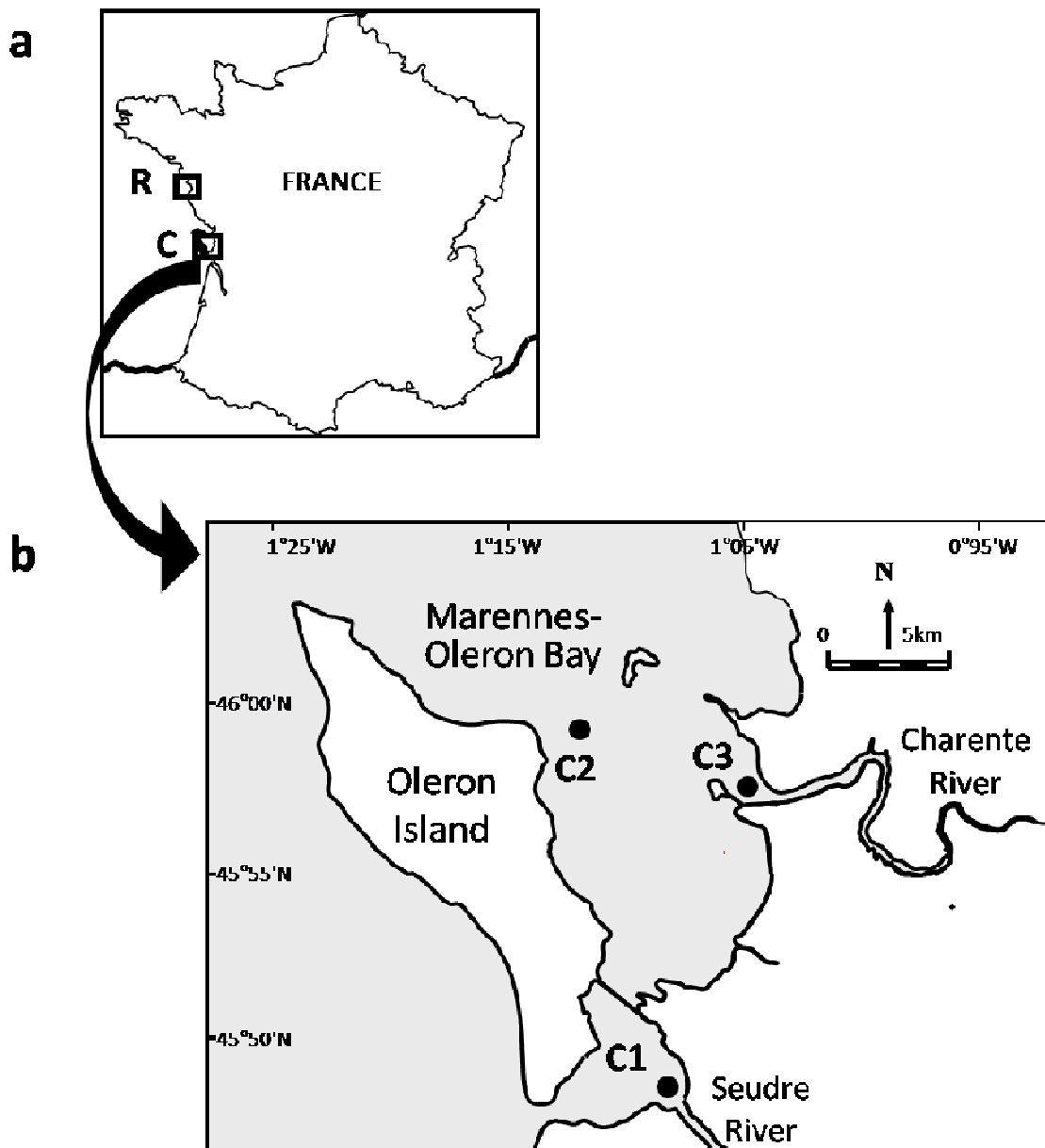


Figure 1 Estuarine sampling areas in French Atlantic coast: **a** localization of reference (*R*) and contaminated (*C*) sites in France and **b** localization of contaminated sites Mus du Loup (*C1*), Boyard (*C2*), and Les Palles (*C3*) in Marennes-Oleron Bay

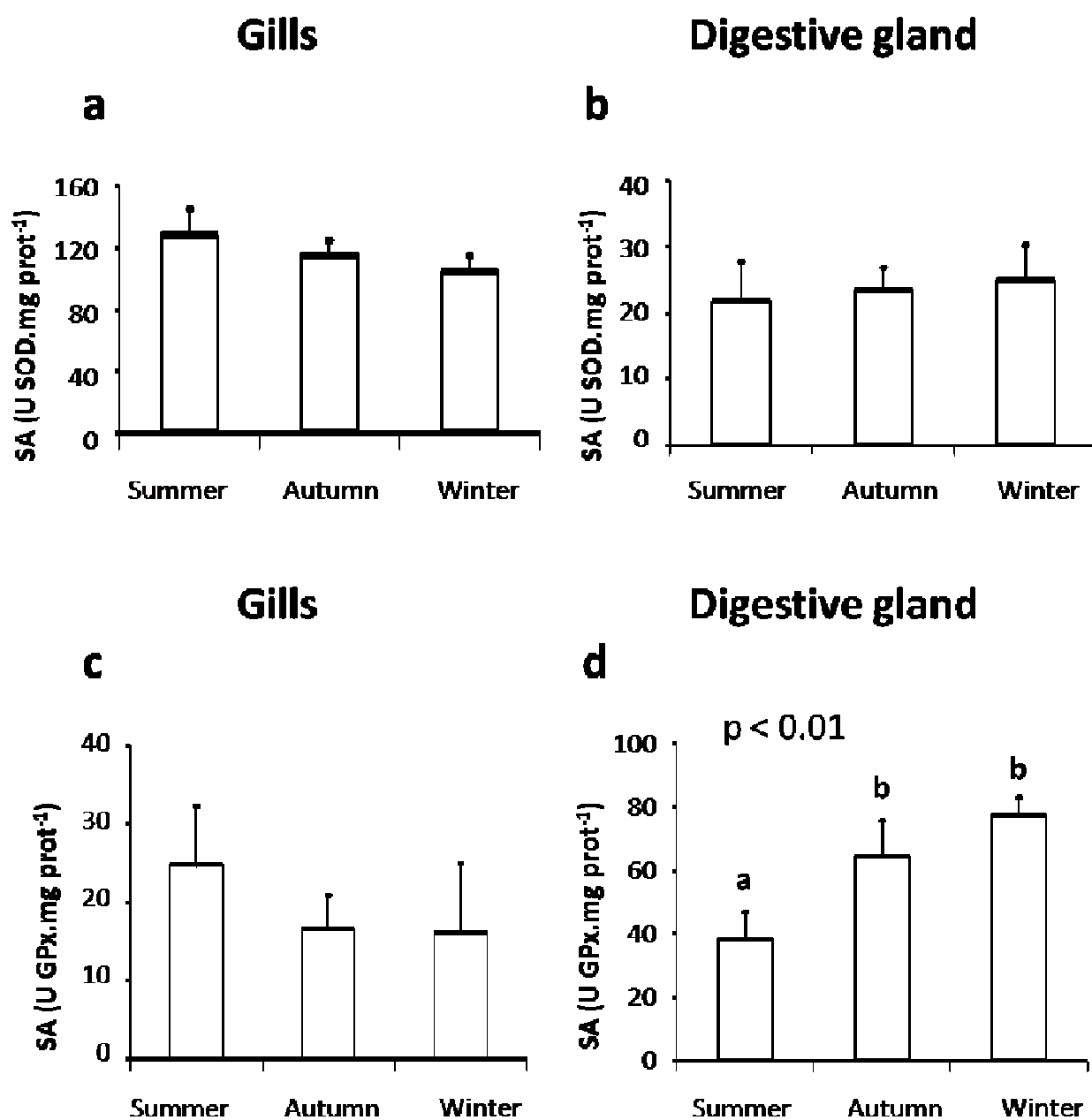


Figure 2 Seasonal variations on SOD (a and b; in units of SOD per minute per milligram of protein) and GPx (c and d; in units of GPx per minute per milligram of protein) in gills and digestive gland of *C. gigas* collected from the reference site (Bouin). Letters indicate significant differences between seasons ($p < 0.01$). Data are expressed as mean \pm SD

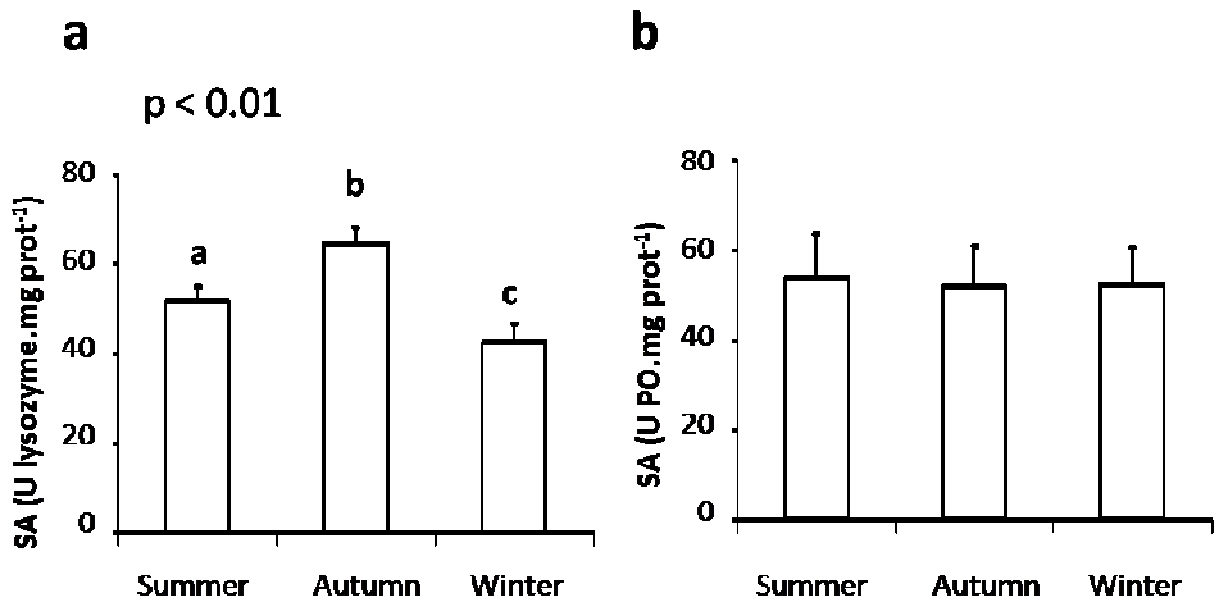


Figure 3 Seasonal variations on **a** lysozyme (in units of lysozyme per minute per milligram of protein) and **b** PO (in units of PO per minute per milligram of protein) in plasma of *C. gigas* collected from the reference site (Bouin). Letters indicate significant differences between seasons ($p < 0.01$). Data are expressed as mean \pm SD

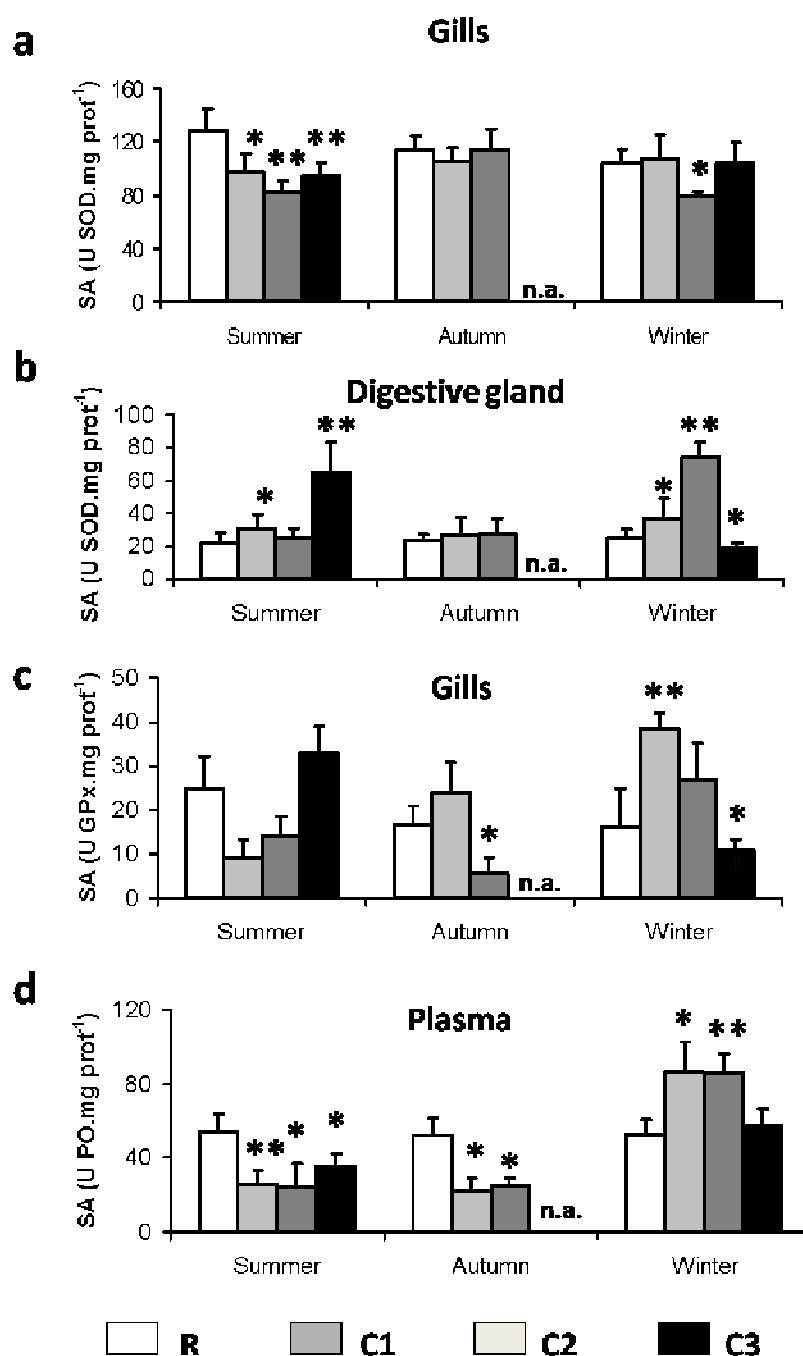


Figure 4 SOD in gills and digestive gland, GPx in gills, and PO in plasma in *C. gigas* collected from contaminated and reference sites. *R* reference site (Bouin, white bars), *C1* contaminated site 1 (Mus du Loup, light grey bars), *C2* contaminated site 2 (Boyard, dark grey bars), *C3* contaminated site 3 (Les Palles, black bars). Data are expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Table 1 Pollutant contents in oysters and physicochemical and biological parameters of the reference (Bouin, R) and contaminated sites (Mus du Loup, C1; Boyard, C2; Les Palles, C3) in summer (S), autumn (A), and winter (W) 2008

	National median	R			C1			C2			C3		
		S	A	W	S	A	W	S	A	W	S	A	W
Pollutant contents^a													
Metals (mg.kg⁻¹)													
Ag	7.69		19.50			12.30			16.20			29.90	
Cd	1.61		1.75			3.73			2.75			3.82	
Cr	0.84		1.07			1.23			1.04			1.29	
Cu	206		385			262			281			500	
Hg	0.20		0.19			0.32			0.32			0.36	
Ni	1.01		1.30			1.28			1.22			1.22	
Pb	1.30		1.30			1.60			1.45			1.55	
V	1.32		1.32			1.75			1.33			1.72	
Zn	2265		2360			2435			2680			4020	
Pesticides (µg.kg⁻¹)													
DDT, metabolites	5.22		5.76			8.31			4.28			5.03	
Lindane	0.74		0.39			0.90			0.79			0.46	
PAHs (µg.kg⁻¹)													
Fluoranthene	27.0		20.2			33.7			27.8			23.5	
Physicochemical parameters													
Temperature (°C) ^b	n.a.	18.39 ± 1.73	15.33 ± 2.89	8.83 ± 2.18	19.93 ± 2.09	15.59 ± 3.12	9.76 ± 2.64	19.26 ± 1.96	15.58 ± 3.48	9.36 ± 1.97	20.13 ± 1.98	16.35 ± 3.49	8.01 ± 1.56
Temperature (°C) ^f	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	19.40	18.90	8.20	20.08	19.20	7.85	20.50	18.65	7.10
Biological parameters													
Chlorophyll a (mg.m ⁻³) ^b	n.a.	1.62 ± 1.91	1.04 ± 0.91	1.11 ± 0.90	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	5.35 ± 3.28	2.39 ± 1.41	0.80 ± 0.37
Chlorophyll a (mg.m ⁻³) ^c	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2.58	1.65	0.62	2.83	3.43	1.045	2.35	1.72	1.12
Condition index ^d	n.a.	31.85 ± 5.43	23.90 ± 1.42	17.15 ± 1.42	55.19 ± 1.63	30.74 ± 3.27	17.52 ± 0.94	40.17 ± 1.49	19.22 ± 1.93	16.73 ± 2.42	42.93 ± 3.02	n.a.	19.71 ± 1.94

n.a. not available

^a Mean values adapted from 2003 to 2007 data of the website "Site Ifremer consacré à l'environnement littoral": <http://www.ifremer.fr/envlit/>.

^b Mean values ± SD adapted from 2000 to 2004 data of the website "Site Ifremer consacré à l'environnement littoral": <http://www.ifremer.fr/envlit/>.

^c Mean values of 2008, collected by the French network Razlec (Ifremer, http://www.ifremer.fr/lerpc/reseaux/hydro/resul_hydro.htm). Values correspond to the mean of July, September and December of 2008 of two measurements carried out per month at the bottom and at the top of the water surface from C1 and sites near C2 and C3.

^d Condition index from juvenile oysters was calculated by the method of Lobel and Wright (1982), and expressed in mg dry flesh weight/g dry shell weight

Annexe 9 : Biological effects of persistent organic pollutants in juveniles of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a transplantation study in the French Atlantic coast

Biological effects of persistent organic pollutants in juveniles of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a transplantation study in the French Atlantic coast

Luna-Acosta, A.¹, Bustamante, P.¹, Budzinski, H.², Huet, V.¹, Thomas-Guyon, H.¹

¹ Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges - F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

² Laboratoire de Physico-ToxicoChimie des systèmes naturels (LPTC), UMR5255, CNRS-Université de Bordeaux 1, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France

* Corresponding authors: A. Luna-Acosta and P. Bustamante
Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs),
UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle,
2 rue Olympe de Gouges
F-17042 La Rochelle Cedex 01, France
Email : aluna1508@yahoo.com / pbustama@univ-lr.fr
Tel : +33 (0)5 46 50 76 50
Fax : +33 (0)5 46 50 76 63

Abstract

Contaminant effects on defence responses on ecologically and economically important organisms, such as the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, could influence their ability to resist to infectious diseases, particularly at the young stages. The aim of this study was to explore potential relationships between organic contaminants accumulated in the soft tissues of juvenile oysters, defence responses and physiological condition. To this end, oysters were transplanted during summer and winter periods in different sites in the Gironde estuary and the Marennes-Oleron Bay, being the biggest estuary in occidental Europe and the first production area in France, respectively. Whole oyster soft tissues from each site were analyzed for PAHs, PCBs, PBDEs and OCPs. Overall, in comparison to other coastal areas and estuaries, the Marennes-Oleron Bay and the Gironde estuary can be considered as low to moderately contaminated areas. More specifically, the sites of Boyard and Mus du Loup showed to be the most contaminated sites, with high OCPs and PAHs contents in oyster tissues. Contaminant concentrations, physiological conditions such as the condition index and the energetic reserves stored in the digestive gland, and defence responses, such as antioxidant enzyme (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and associated lipid peroxidation), catecholase-type phenoloxidase, laccase-type PO and lysozyme activities varied among tissues, sites and seasons. In addition to that, correlation analyses demonstrate significant relationships between most defence-related characteristics and at least one contaminant type, and more particularly PAHs and OCPs. In combination with other recent studies, these results strengthen the hypothesis that certain organic contaminants may be associated with modulations in oyster enzyme activities implicated in defence mechanisms, even though ultimate influence on disease resistance remains unknown.

Key words: bivalve – oxidative stress – immune humoral defences – seasonality – pollution

1. Introduction

Coasts and estuaries constitute areas providing habitats for various organisms, support very high productivity and are used as nursery grounds for juveniles of several species (Johnston 1981). Because of the presence of human activities near these zones, these areas are frequently contaminated with organic compounds, such as polychlorinated biphenyls (PCBs), polybrominated diphenylethers (PBDEs), organochlorine pesticides (OCPs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Among organisms inhabiting these areas, the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1753), is the leading aquaculture product at the worldwide level (FAO 2010). As other bivalve molluscs, this sessile and filter-feeder organism can bioaccumulate contaminants in its tissues (Livingstone 1993, Auffret et al. 2004) and survey networks such as the chemical contamination monitoring network ROCCH (Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du littoral, previously RNO, France) use *C. gigas* as a sentinel species. However, massive summer mortalities of this organism, particularly of juveniles, have become a widespread concern in the world in recent decades (Perdue et al. 1981, Cheney et al. 2000, Garnier et al. 2007). Environmental stress from contaminants seems to be an important determining factor that weakens defence mechanisms in these organisms, thus enhancing the occurrence or the increase of diseases, more particularly in young life stages (Perdue et al. 1981, Lacoste et al. 2001).

Immune defence mechanisms have been used in the past to detect sensitive signals for deleterious effects of contamination in laboratory-controlled conditions (Tanguy et al. 2005, Gagnaire et al. 2007, Bado-Nilles et al. 2008) or in the field (Cajaraville et al. 2000, Orbea et al. 2002). For instance, antioxidant enzyme activities such as superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6) and glutathione peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9), or enzyme activities implicated in humoral defences such as lysozymes (EC 3.2.1.17) and phenoloxidases (PO, EC 1.14.18.1) have shown to be modulated by the presence of contaminants (Cheung et al. 2004, Verlecar et al. 2007, Bado-Nilles et al. 2008, Stabili & Pagliara 2009).

Marennes-Oleron Bay is the first production site of *C. gigas* in France (Soletchnik et al. 1999), but this area is also subjected to many recurring anthropogenic contamination by heavy metals, persistent organic pollutants (POPs) and PAHs, brought mainly by the Charente River and to a less extent by the Seudre and the Gironde rivers (Miramand et al. 2003, Munaron et al. 2006). The present study aims to characterize biochemical responses to spatial variation of exposure contaminants in juveniles of the Pacific oyster *C. gigas* on the French Atlantic coast, and their impact on enzyme activity modulations in different tissue. To this end, oysters were transferred from a reference site (Bouin) to different sites in the Marennes-Oleron Bay and the Gironde Estuary and 1) levels of PAHs, PCBs, PBDEs and OCPs and 2) enzyme activities (i.e. SOD, CAT, GPx, catecholase-type PO, laccase-type PO and lysozyme) and malondialdehyde (MDA) were determined in oyster tissues from the reference and the transferred sites. Moreover, the condition index was analyzed as index endpoint, and

was compared to energetic reserves (glycogen, proteins and lipids) in a reserve organ, the digestive gland (De La Parra et al. 2005). Studies were carried out in two different seasons, i.e. summer and winter and an additional transplant site, located at the end of the biggest estuary in occidental Europe (Brosse 2003), i.e. the Gironde estuary, was added to the study (Cordouan).

2. Materials and methods

2.1 Study area and transplant design

Juvenile Pacific oysters *C. gigas* (3-4 cm in height, 1 year-old) were purchased from the oyster hatchery France Naissain, located at Bouin (B) in Vendée, France (46° 58' 28" North, 2° 00' 02" West), considered as a reference site (Fig. 1a), i.e. located in a zone possessing different seawater physico-chemical characteristics in comparison to the transplant zone (Geffard *et al.* 2002). All animals were issued from the same cohort in order to reduce genotype variability. Juveniles were transplanted from B to four sites, Boyard (BOY; 45° 58' 0" North, 1° 15' 0" West), mildly influenced the Gironde and the Charente rivers; Les Palles (LP; 45° 58' 0" North, 1° 08' 0"), highly influenced by the Charente River; Mus du Loup (ML; 45° 46' 10" North, 1° 08' 30" West), mildly influenced by the Seudre River and Cordouan (C; 45° 35' 11" North, 1° 10' 24" West), highly influenced by the Gironde river (Fig. 1b). Three months after transplantation, nine oysters from each site were collected in summer (June 2008) and winter (December 2008) and were processed immediately after their arrival in the laboratory.

2.2. Sample procedure

Pooled gills, digestive glands and plasma of three oysters were used for each replicate sample, and three replicates were prepared per season and per site. After opening the oyster shells by cutting off the adductor muscle, a quantity of hemolymph (~ 0.3-0.5 ml for the three oysters) was withdrawn and centrifuged (260xg, 10 min, 4°C) to separate the cellular fraction from the plasma. Gills and digestive gland were removed from the oysters. For a pool of three oysters, about 0.7 ± 0.1 g of gills and 4.2 ± 1.2 g of digestive gland were homogenized at 4°C in 0.1 M Tris HCl buffer pH 7.0 (0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂; 0.5 ml of buffer.g⁻¹ of fresh weight for the gills and 1 ml.g⁻¹ of fresh weight for the digestive gland), using an Ultra Turrax (T25 basic, IKA-WERKE) and a Thomas-Potter homogenizer (IKA-Labortechnik RW 20.n, size 0.13-0.18 mm, BB). The homogenate was centrifuged at 10 000xg for 10 min at 4°C. The resulting supernatant was collected for enzymatic studies.

2.3. Chemical analysis

Polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and polybrominated diphenylethers (PBDE) were measured on a gas chromatograph (HP 6890, Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a splitless injector and coupled to an MSD 5973 mass spectrometer (Baumard et al. 1999). A total of 31 PAH compounds and 4 PBDE congeners were analyzed (Tables 1 and 2).

Organochlorine compounds, i.e. polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs), were quantified on a gas chromatograph (HP 5890, Hewlett Packard, Palo Alto, Ca, USA) equipped with a splitless injector and coupled to an electron capture detector (Thompson & Budzinski 2000). A total of 10 PCB congeners and 13 OCPs were analyzed (Tables 2 and 3). Concentrations of organic contaminants are expressed in $\mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight (dw).

2.4. Biological analysis

Superoxide dismutase (SOD) assay • SOD was determined by an indirect method (Therond et al. 1996), based on competition of SOD with iodinitrotetrazolium (INT) for dismutation of superoxide anion (O_2^-). In the presence of O_2^- , INT is reduced into a red formazan dye that can be measured at 505 nm at 25°C (kit Ransod SD 125, Randox, France). One unit of SOD is defined as the amount of enzyme that promotes a 50% decrease in the rate of INT reduction.

Catalase (CAT) assay • CAT activity was determined according to the method of Fossati *et al.* (1980). This assay method is based on the measurement of the hydrogen peroxide substrate remaining after the action of catalase. First, catalase converts hydrogen peroxide to water and oxygen and then this enzymatic reaction is stopped with sodium azide. An aliquot of the reaction mix is then assayed for the amount of hydrogen peroxide remaining by a colorimetric method (Kit Catalase CAT-100, Sigma).

Glutathione peroxidase (GPx) assay • GPx activity was determined according to the method of Paglia & Valentine (1967). In the presence of glutathione reductase and substrates (i.e., reduced glutathione and cumene hydroperoxide), the decrease of absorbance at 340 nm is proportional to the reduction of the oxidised glutathione by NADPH, H^+ (Kit Ransel RS 504, Randox, France). One unit of GPx oxidizes 1 nmol of NADPH ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) per minute.

Catecholase-type phenoloxidase (PO) and laccase-type PO assay • Spectrophotometric measurements of catecholase-type PO and laccase-type PO activities were made as in previous work (Luna-Acosta *et al.* 2010). Assays were carried out in triplicate for each sample. Briefly, catecholase-type PO assay was carried out in the presence of 100 mM dopamine and 0.1 M Tris HCl buffer, pH 7.0 (0.45 M NaCl, 26 mM MgCl_2 , 10 mM CaCl_2 ; Sigma-Aldrich, France). Catecholase activity was followed by monitoring the increase of absorbance at 490 nm for 4 h. Laccase assay was carried out in the presence of 50 mM of p-phenylenediamine (PPD), diluted in methanol, and 0.1 M Tris HCl buffer, pH 7.0. Laccase activity was followed by monitoring the increase of absorbance at 420 nm for 2 h.

Nonenzymatic oxidation by the substrate was followed in wells without oyster sample and subtracted to oxidation of the substrate with oyster sample. One unit of catecholase specific activity and one unit of laccase specific activity correspond to the amount of enzyme that catalyzes the production of 1 μ mole of product ($\epsilon = 3\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ and $43\,160\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectively), per minute and per milligram of protein (Espin *et al.* 1995, Eggert *et al.* 1996).

Lysozyme assay • Lysozyme assay was done in triplicate for each sample and compared against hen egg white lysozyme standards ($0.4\text{-}40\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), in the presence of *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, France). One unit of lysozyme corresponds to the amount of enzyme that diminishes absorbance at 450 nm of 0.001 per minute at pH 7.0, at 25°C (Soudant *et al.* 2004).

Malondialdehyde (MDA) assay • Lipid peroxides, derived from polyunsaturated fatty acids, are unstable and decompose to form a complex of series of compounds, of which the most abundant is MDA (Gerard-Monnier *et al.*, 1988). The method to determine MDA levels in the gills and the digestive gland (MDA-586, Oxis Research, Portland, OR, USA) was based on the reaction of a chromogenic reagent, N-methyl-2-phenylindole (NMPI) with MDA at 45°C. One molecule of MDA reacts with two molecules of NMPI to yield a stable carbocyanine dye with maximum absorption at 586 nm. The MDA in the sample was determined from the sample's absorbance at 586 nm and the standard curve was prepared using the MDA standard provided in the kit.

Glycogen assay • Digestive gland samples were freeze dried and weighed before determining glycogen, lipids and protein contents. Glycogen content (precipitated with absolute ethanol) was quantified using the phenol-sulphuric method as described by Dubois *et al.* (1956). Known glucose standards were processed in the same way as the samples and used to construct a calibration curve.

Lipid assay • Lipids were extracted according to the procedure of Folch *et al.* (1957). A double static extraction (2x12h) was carried out on the rehydrated samples with a chloroform:methanol mixture (1:2 then 2:1, v/v) in polytetrafluoroethylene (PTFE)-capped tubes held at 4°C, under a nitrogen atmosphere. Following the addition of a salt solution (NaCl 1%), the crude extract was separated into two phases. The lower chloroform phase containing lipids was washed gently with a new volume of the upper phase. After centrifugation for 10 min at 3000 g at 10°C and decantation, it was recovered and stored at -20°C until analysis. Total lipids were measured using a Iatroscan-Chromarod system (thin layer chromatography-flame ionization detection (TLC-FID)) connected to a Shimadzu CR3A integrator. Five successive volumes (1 μ l) of a concentrated extract aliquot were spotted on a Chromarod SIII silica rod with a 2 μ l Hamilton microsyringe. After drying in a dessicator, the rod was read directly by the Iatroscan without any development. A calibration curve based on a total lipid extract from cod liver oil, with similar lipid characteristics than oyster tissues, was used to calculate the lipid concentration of the sample extracts.

Protein assay • Protein concentration measured according to the Lowry method with slight modifications, by using bicinchoninic acid and copper sulphate 4% (Smith *et al.* 1985). Serum

albumin was used as standard (Sigma-Aldrich, France). All enzyme activities were expressed in relation to protein concentration.

Condition index • Condition index in juvenile oysters was calculated by the method of Lobel and Wright (1982), and expressed in mg dry flesh weight g⁻¹ dry shell weight.

2.5. Statistical analysis

All values are reported as mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was carried out with STATISTICA 7.0. Values were tested for normality (Shapiro test) and homogeneity of variances (Bartlett test). In some cases, logarithmic transformations (Log₁₀) were used to meet the underlying assumptions of normality and homogeneity of variances. Two-way nested ANOVA were used to analyze results, with site and seasons as fixed factors, and pool as random factor. Pool was nested within each combination of season and site (Zar 1984). When the null hypothesis (H₀: no difference between treatments or within treatment at different time intervals) was rejected, significant differences were tested using Tukey's HSD test. One-way ANOVA was used to compare oyster contaminant contents between different seasons. For non normal values, i.e. to compare oyster contaminant content between different sites for a given season, a Kruskal-Wallis test was used, followed by a Dunn's multiple comparisons test. Statistical significance was designed as being at the level of p < 0.05, p < 0.01 or p < 0.001. Spearman's rank correlation analysis was used to test whether the levels of enzyme responses were related to contaminant concentrations in oyster tissues. Spearman rank coefficients which were only significant with p < 0.01 or p < 0.001 were retained for analyses.

3. Results

3.1. Chemical accumulation

Tables 1, 2 and 3 showed the levels of PAHs, PCBs and OCPs in oyster soft tissues. Over the different sampling stations and seasons, these levels ranged between 81±11 and 236±43 µg.kg⁻¹dw for PAHs, 15±1 and 89±39 mg.kg⁻¹ for PCBs, 0.4±0.3 and 2.9±0.7 µg.kg⁻¹ for PBDEs, 3±0 and 19±1 µg.kg⁻¹ for OCPs (Tables 1-3).

3.1.1. PAHs

Levels of PAHs were significantly affected by the season (F_{1,28}=11.95, p=0.002), with mean PAH levels being ~1.5 higher in winter than in summer (124±10 and 181±16 µg.kg⁻¹ dw, respectively). In summer, PAH levels were ~2.5-fold higher in oysters from LP than in oysters from ML and C but no significant differences were found with the reference site (Table 1). In winter, PAH levels in oysters from BOY being ~1.5-fold higher than in oysters from B. Significant differences were also observed between C and BOY, LP and ML, with PAH levels in oysters from BOY, LP and ML being ~1.5 to 2-fold higher than in C (Table 1).

Phenanthrene, fluorene, triphenylene+chrysene, benzo(b,k,j)fluoranthene and C₂-Naphthalene accounted among the most accumulated PAHs in oyster tissues: in B, the most accumulated PAHs were phenanthrene and benzo(b,k,j)fluoranthene (12-15%), in BOY, phenanthrene (9-11%), benzo(b,k,j)fluoranthene (8-16%) and fluorene (9-14%), in LP, benzo(b,k,j)fluoranthene (10-12 %) and fluorene (17-19%), in ML, benzo(b,k,j)fluoranthene (18-20%), in C, benzo(b,k,j)fluoranthene (9-11%) and fluorene (8-14%; Table 1). In all sites and all season, parent PAHs were more present than alkylated PAHs with a percentage of 70-90% of total PAHs. Heavy PAHs (containing more than 3 aromatic rings) represented 60-80% of total PAHs, except for B and C in summer where they accounted for 46% of total PAH (Table 1).

3.1.2. PCBs

Within stations, levels of PCBs were not significantly affected by the season ($F_{1,28}=0.02$, $p=0.88$). However, in summer and winter, significant differences were observed between the reference (B) and the transplant sites, with PCB levels in oysters from the former being ~2-5-fold higher than in oysters from LP, ML and C (Table 2). Oysters accumulated mainly penta- (18 to 40%) and hexachlorobiphenyls (30 to 70%) and the hexachlorobiphenyl congener PCB153 was the most accumulated PCB, accounting for 30 to 50% of total PCBs.

3.1.3. PBDEs

Within stations, levels of PBDEs were not significantly affected by the season ($F_{1,28}=3.56$, $p=0.07$). No significant differences were observed between PBDE levels in summer, independently of the site (Table 2). In contrast, PBDE levels were being ~2 to 5-fold higher in oysters from the reference site (B) than those from transplant sites in winter.

3.1.4. OCPs

Levels of OCPs were significantly affected by the season ($F_{1,28}=8.06$, $p<0.001$), with OCP levels being slightly higher in winter than in summer (Table 3). In summer, OCP levels in oysters from B and BOY were ~3-3.5-fold higher than in oysters from ML and C. In winter, OCP levels were significantly higher (~2-fold) in oysters from BOY than in oysters from B. Moreover, OCP levels in oysters from BOY were ~1.5-3-fold higher than in oysters from LP and C.

DDT metabolites and lindane were the most accumulated OCPs. The more accumulated OCP compounds were: ~21% of lindane and ~22% of 2,4'-DDE of total OCPs in B samples, ~26% of 2,4'-DDE and 33% of 4,4'-DDE+dieldrin in BOY samples, 28, 26 and 33% of 4,4'-DDE+dieldrin in LP, ML and C samples, respectively, and 23, 34 and 30% of 4,4'-DDD in LP, ML and C samples, respectively.

3.2. Modulation on condition index and energetic reserves in the digestive gland

Condition index varied depending on the season and the site (Fig. 2a). Significant differences between reference and transplant sites were observed in summer. An increase of the condition index was observed in a South-North gradient, with higher values observed in C: in comparison to the condition index of oysters from B, the condition index was ~1.3, ~1.3, ~1.7 and ~2-fold higher in BOY, LP, ML and C, respectively. This increase in the condition index was due to an important increase in dry flesh weight (Fig. 2b). In winter, juvenile oysters were 6 months older than in summer. An increase of dry shell weight was observed between summer and winter in oysters from B, but a decrease in the dry flesh weight (Fig. 2c) and thus a decrease of 50% in the CI were observed. Contrary to summer, no differences in the condition index were observed between oysters from B and the transplant sites.

Glycogen, protein and lipid contents in the digestive gland varied depending on the season and the site (Fig. 3a). In summer and in comparison to B, ~1.6- and ~2-fold higher lipid contents were observed in oysters from LP and C and ~2-, ~1.8-, ~1.5- and ~2-fold higher protein contents were observed in BOY, LP, ML and C (Fig. 3a). A decrease of ~50% in lipid contents was observed in oysters from B between summer and winter. In winter and in comparison to B, a ~2.5- and ~2-fold higher glycogen and protein contents (Fig. 3a) were observed in oysters from BOY, respectively. A ~2.3-, 3- and 1.5-fold higher glycogen, lipid and protein contents were observed in oysters from C, respectively. A ~1.5-fold higher protein content was observed in LP and ML. When comparing these results to the total dry flesh weight, the digestive gland weight decreased in oysters from BOY, ML and C in summer, and increased in BOY, LP, ML and C in winter in comparison to samples from B (Fig. 3b). Lipid accounted from 60 to 70% of the total energetic reserves, glycogen from 5 to 15% and proteins from 10 to 20% (Fig. 3c).

3.3. Modulation on enzyme activities implicated in defence mechanisms in oysters

3.2.1. SOD

SOD activities varied depending on the season, the site and the analysed tissue (Fig. 4). In comparison to the reference site, SOD activities were inhibited by 40%, in the gills, and by 80% in the mantle in oysters from C in summer. In winter, SOD activities were inhibited by 35% in the gills and by 90% in the mantle of oysters from C, and by 20% in the mantle of oysters from ML. In contrast, SOD activities were ~3-, 1.25- and 2.5-fold higher in the digestive gland, the mantle and the plasma of oysters from LP in summer. SOD activities were also ~4 and ~1.25-fold higher in the plasma and in the mantle of oysters from BOY and ML, respectively. SOD activity was ~3.5-fold and ~5-fold higher in the digestive gland and in the plasma in oysters from BOY.

3.2.2. CAT

CAT activities varied depending on the season, the site and the analysed tissue (Fig. 5). No significant differences were observed in CAT activities in the mantle of oysters from different sites and seasons (data not shown). A seasonal variation was observed in the digestive gland samples of oysters from B, with CAT levels in winter being 60% lower than in summer. In comparison to oysters from the reference site, CAT activities were inhibited by 60,100 and 90% in the gills, the digestive gland and the plasma of oysters from C in winter. In summer, CAT activities were ~1,5-, 2- and 3-fold higher in the gills, the digestive gland and the plasma of oysters from LP, respectively. CAT activities were also ~1.5-fold higher in the gills of oysters from BOY, and ~2-fold higher in the digestive gland of oysters from C. In winter, CAT levels were 5-fold higher in the plasma of oysters from BOY, and ~3-fold higher in the digestive gland of oysters from ML.

3.2.3. GPx

GPx activities varied depending on the season, the site and the analysed tissue (Fig. 6). Not significant differences were observed in GPx activities in the mantle of oysters from different sites and seasons (data not shown). A seasonal variation was observed in the digestive gland samples of oysters from B, with GPx levels in winter being ~1.75-fold higher than in summer. GPx activities in the gills of oysters from C were ~2.5-fold higher in summer and ~3-fold higher in winter, in comparison to oysters from the reference site. In winter, GPx activities were also higher (~3-fold) in the digestive gland of oysters from C. Independently of the season, GPx activities were inhibited by 20, 20, 20 and 60% in the plasma of oysters from BOY, LP, ML and C, respectively. In winter, GPx activities were also inhibited in the digestive gland of oysters from BOY (~75%) and ML (~100%).

3.2.4. MDA

Since small modulations of the enzyme activities were observed in the mantle, and because of a lack of enough plasma sample to carry out these analyses, MDA levels were only measured in the digestive gland and in the gills (Fig. 7). In the summer, MDA levels were ~1.5-fold higher in the digestive gland of oysters from BOY and ML in comparison to the reference site. In winter, MDA levels were ~3-fold and ~2-fold higher in BOY and in C. In LP, MDA levels were ~2-fold higher in the digestive gland and ~10-fold higher in the gills. MDA levels were also ~7-fold higher in the gills of oysters from ML.

3.2.5. Catecholase

Catecholase activities varied depending on the season, the site and the analysed tissue (Fig. 8). In comparison to oysters from the reference site, catecholase activities in winter were inhibited by 15 and 50% in the gills and in the mantle of oysters from BOY and by 100% in the mantle of oysters from C. Catecholase activities were ~2-3-fold higher in the digestive gland of oysters from all transplant sites. Catecholase activities were also higher (~4-fold) in

the mantle of oysters from ML in summer, and ~2-fold higher in the gills of oysters from C and in the plasma of oysters from BOY and ML.

3.2.6. *Laccase*

Laccase activities varied depending on the season, the site and the analysed tissue (Fig. 9). A seasonal variation was observed in the mantle and plasma of oysters from B, with laccase levels in winter being ~25% lower and ~2-fold higher than in summer, respectively. In comparison to oysters from B and independently of the season, laccase levels were ~30-90% lower in the transplant sites in comparison to oyster samples from B. In the mantle, laccase levels were also inhibited in the transplant site, by 50-80% and in both seasons, except for C samples in summer were laccase levels were not significantly different to laccase levels in samples from the reference site. In winter, laccase activities were inhibited by 80-90% and by 50-60% in the digestive gland and in the mantle of oysters from BOY and LP, respectively. In winter, laccase activities were inhibited by 60% in the digestive gland of oysters from BOY and C, and ~30% lower or ~1.75-higher in the gills of oysters from BOY and C, respectively.

3.2.7. *Lysozyme*

Lysozyme activities varied depending on the season, the site and the analysed tissue (Fig. 10). A seasonal variation was observed in the gills and the digestive gland of oysters from the reference site, with lysozyme levels in winter being 36 and 50% lower than in the summer, respectively. In oyster samples from BOY, lysozyme levels were ~30 and ~40% lower in the gills and in the digestive gland in summer, and ~40 and ~30% lower in the gills and in the plasma in winter. In oyster samples from LP, lysozyme levels were ~85 and ~30% lower in the digestive gland and in the plasma in summer, but not in winter. In oyster samples from ML, lysozyme levels were ~30% lower in the mantle and in the plasma in summer but not in winter. In oyster samples from C, lysozyme levels were 55, 85 and 70% lower in the gills, the digestive gland and the plasma in summer and ~40 and 12% lower in the digestive gland and in the plasma in winter.

3.4. Relationships between biological responses and contaminant contents in oysters

3.4.1. *Relationships per site*

Spearman rank correlations were carried out to establish potential relationships between enzyme activities implicated in immune defence mechanisms and contaminant contents in juvenile oysters. Only significant correlations with $p < 0.01$ or $p < 0.001$ were retained in this study. Significant correlations between contaminant contents and biological responses are summarized in Table 4. These correlations differed between sites.

In B, significant negative correlations were observed between CAT in the gills and OCPs levels. In BOY, positive correlations were observed between HAP and PC levels, and

catecholase in the plasma and GPx in the gills. Negative correlations were observed between HAPs and OCPs levels, and laccase in the gills.

In C, OCPs were positively correlated to lysozyme in the gills and in the digestive gland.

In LP and ML, different correlations were observed depending on the contaminants, the enzyme activity and the tissue that was analyzed. In LP, most significant correlations concern negative correlations between PCB and PBDE levels, and CAT in the plasma and positive correlations between OCP levels and laccase in the digestive gland and lysozyme in the plasma. In ML, most significant correlations concern negative correlations between HAPs and OCPs levels and catecholase in the gills, lysozyme in the digestive gland and GPx in the mantle.

3.4.2. Relationships per season and overall seasons and sites

Different correlations were observed between enzymatic activities and contaminant contents in oysters, depending on the tissue and on the season. As an overall trend, MDA levels were positively correlated to levels of PAHs or DDT (and metabolites), catecholase levels were positively or negatively correlated to PAHs, negatively correlated to PCBs or negatively correlated to OCPs. Laccase were negatively correlated to PAHs, and positively correlated to PCBs and OCPs. SOD and CAT were positively correlated to PAHs, while GPx were negatively correlated to PAHs (Tables 5, 6 and 7).

When comparing contaminant contents with enzyme activities in oyster tissues in summer, significant negative correlations were observed between the condition index and the sum of OCPs, PAH levels were negatively correlated to the dry weight. In winter, significant positive correlations were observed between the condition index and PAHs and more particularly with heavy PAHs, while the dry weight was not significantly correlated to contaminant contents.

In summer, no significant correlations were observed between antioxidant enzyme activities and contaminant contents (data not shown). However, MDA levels in the gills were positively correlated to the sum of heavy PAHs, to the sum of parent PAHs and to the sum of total PAHs, but not to other contaminants (Table 5).

Catecholase levels in the gills were negatively correlated to levels of light PAHs, but not to other contaminant contents. In the digestive gland, laccase levels were negatively correlated with heavy PAHs. In the mantle, catecholase levels were negatively correlated to PCBs and to OCPs, and lysozyme levels were positively correlated to OCPs. In the plasma, laccase levels were positively correlated to PCBs and to OCPs and lysozyme levels were positively correlated to OCPs.

In winter, catecholase and laccase levels in the gills, catecholase levels in the digestive gland, laccase levels in the mantle, GPx levels in the digestive gland and in the mantle were negatively correlated to light, heavy, parent forms or total PAHs (Table 6). In contrast, CAT levels in the digestive gland, SOD levels in the mantle and in the plasma, catecholase levels in the plasma were positively correlated to light, heavy, parent forms or total PAHs. In addition to that, MDA levels in the digestive gland were positively correlated to levels of

DDTs (and metabolites), catecholase levels in the digestive gland were negatively correlated to PCB levels, and lecase levels in the plasma were positively correlated to PCBs.

When putting data from summer and from winter together, MDA levels in the gills were significantly correlated to PAHs, and more particularly to the parent forms of PAHs and to the heavy PAHs, catecholase levels in the gills were strongly negatively correlated to PAHs and moderately negatively correlated to OCPs. Catecholase levels in the plasma were positively correlated to PAHs (Table 7).

4. Discussion

4.1. Chemical contamination in the Marennes-Oleron Bay and in the Gironde Estuary

Marine environments, particularly those near industrial areas, are frequently contaminated with petroleum hydrocarbons as the results of accidental spill, industrial and urban runoff and/or shipping activities (Head & Swannell 1999). Two sources of hydrocarbons may be present in the environment: pyrolytic hydrocarbons, which are produced by the incomplete combustion of organic matter, and/or petrogenic hydrocarbons, which are present in the marine environment as a result of spillage oil of diesel and/or fuel oil (Readman et al. 2002). The source of accumulated PAH, as determined by calculating the ratios phenanthrene/anthracene, fluoranthene/pyrene and methyl phenanthrene/phenanthrene indicated that PAHs levels were mostly of pyrolytic origin in all seasons and all sites, except for B in summer, BOY in summer and winter and C in winter where, results with phenanthrene/anthracene ratio suggest a potential petrogenic source (Readman et al. 2002; Fig. 11).

In the present study, oysters accumulated mainly penta- and hexachlorobiphenyls. These results are in agreement with Porte & Albaigés 1993, Orbea *et al.* 2002) who also reported these congeners as the most accumulated PCB in oysters and mussels. PCB levels were 50 to 80% lower in the transplant sites than in B. This result suggests that oysters are able to depurate important quantities of PCB if they are transferred to sites possessing low levels of PCB, as in the present study, and this, independently of the season.

PCB concentrations in oysters from B and the transplanted sites were near or below the national median of PCB153 reported by the ROCCH ($17 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{dw}$). Results in B are in agreement with previous results reported by the ROCCH were PCB153 levels have shown to be higher than in the Marennes-Oleron Bay, suggesting a potential contamination source from the Loire river, at proximity of B. However, contrary to the present study, the ROCCH has reported higher PCB levels in the Gironde estuary than in B, with concentrations at Pointallac and La Fosse, two sites at proximity from C, of 65 and $87 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{dw}$. Thus, in the present study, the Marennes-Oleron Bay and the Gironde Estuary presented low to moderate levels of contamination by PAHs, PCBs, OCPs and PBDEs.

4.2. Relationships between contaminants, antioxidant enzyme responses and oxidative stress

PAHs, PCBs, PBDEs and OCPs are hydrophobic compounds. The more hydrophobic a compound is, the more likely it is to associate with non-polar phases, such as lipids and organic carbons (Meador 2003). Overall, heavy PAH, which are more hydrophobic than light PAHs, were more accumulated than the latter. This result is in agreement with Gunther et al. 1999, Orbea et al. 2002), who reported a strong ability of oysters and mussels to accumulate high molecular weight PAHs.

In oyster tissues, seasonal variations of PAH were found for the different compounds, with the maximal levels in winter and the minimal levels in summer. These results are in agreement with *in situ* studies carried out with oysters and mussels in the Bay of Biscay (Orbea *et al.* 2002) and in the northwest coast of the Mediterranean Sea (Bodin et al. 2004) where PAH levels were also higher in winter than in summer. It is important to notice that, between summer and winter in the present study, PAH levels remained stable in B and LP, while PAHs levels increased in BOY, ML and C, suggesting a specific PAH contamination source in the south of Marennes-Oleron Bay (i.e. ML), at proximity of Marennes-Oleron islands (i.e. BOY), and in the Gironde Estuary in winter (i.e. C). Moreover, the results from the present study are in agreement with the physiology of the oysters, notably with the condition index in winter, since positive correlations were found between the condition index and the PAH contents ($r_s=0.67$, $p<0.01$). A different trend is observed in summer since PAHs were negatively but not significantly correlated to the condition index ($r_s=-0.63$, $p>0.01$), and more particularly negatively and significantly correlated to the dry weight ($r_s=0.78$, $p<0.01$; Table 6). These differences could be explained by the fact that, in invertebrates, tissue concentrations appear to follow seasonal cycles, which may be related to variation in lipid content, spawning cycles, or physic-chemical parameters in the environment (Orbea & Cajaraville 2006). In the French Atlantic coast, gamete maturation in oysters takes place between May until June, then, reproduction takes place during summer and, after spawning, a growth rebound starts in the fall (Soletchnik et al. 2006). Thus, our results suggest that PAH accumulation depends on the sexual maturation stage, and that PAH accumulation in oysters is favoured during the growth rebound period.

PAHs can lead to the formation of ROS and enhance oxidative stress in aquatic organisms (Di Giulio et al. 1989, Winston 1991). When oxygen radical species (ROS) overwhelm antioxidant enzyme activities (i.e. SOD, CAT and GPx), ROS can react with different biological molecules and lead to DNA adducts, and lipid and protein degradation (Neumann et al. 2001). Lipid peroxides, derived from polyunsaturated fatty acids, are unstable and decompose to form a complex of series compounds, including carbonyl compounds, which the most abundant is malondialdehyde (Gérard-Monnier et al. 1998). Increased antioxidant activities were found in oysters from contaminated site by PCBs, PAHs and pesticides, and thus, antioxidant enzymes were proposed as useful tools for the biomonitoring of environmental contamination (Rodríguez-Ariza et al. 1993). In fact, antioxidant enzymes

have been widely used for ecotoxicological studies in bivalves. For example, a significant correlation between PAH accumulation in the flesh and SOD and CAT activities in the gills has been found in mussels from the Mediterranean Sea (Porte et al. 1991). Sole et al. (1995) also reported correlations between GPx activity in the digestive gland of molluscs collected in the Mediterranean coast and the organochlorine body burden and SOD activity in the digestive gland and PAH concentrations. Krishnakumar et al. (1995), reported higher CAT activity in the digestive gland of mussels from contaminated sites when compared to those of sampled at a reference site in the North American Pacific coast. However, Orbea et al. (2002) found no relationships between contaminant burdens and induction of antioxidant enzyme activities, the latter seeming to be more affected by seasonal factors other than those related to contaminant body burdens.

In the present study, correlations between contaminant and antioxidant enzyme activities were only observed in winter, probably because winter is a period where oxidative stress is high in bivalves (Manduzio et al. 2004). In winter, results in the present study showed a positive correlation between PAH contents and SOD activities in the plasma and in the mantle. These results are in agreement with different studies that have shown an increase in SOD activity in bivalves exposed to hydrocarbons (Solé et al. 1995, Orbea et al. 2002, Richardson et al. 2008), suggesting that hydrocarbons induced oxidative stress by producing ROS such as O_2^- . In addition to that, CAT activities in the digestive gland were positively correlated to the presence of PAHs, suggesting that O_2^- produced in the plasma and in the mantle is then converted in the digestive gland by CAT catalyzed reactions into H_2O and O_2 and/or that PAHs exerts an oxidative stress by producing also H_2O_2 (Neumann et al. 2001). Moreover, a negative correlation between PAH contents and GPx activities were observed in the digestive gland, probably due to the inhibition of enzyme synthesis by PAHs or to enzyme inactivation caused by high tissue contaminant concentrations (Borg & Schaich 1983). However, since GPx and CAT catalyze transformation of H_2O_2 to H_2O , they may act on common substrates and thus, a competition may exist for the same group of substrates (Kappus 1985). Significant positive correlations were observed between MDA levels and PAHs, especially heavy PAHs in the summer, but not with other contaminants, suggesting that PAH exert a lipid peroxidation in summer but not in winter. However, PAH levels in summer were lower than PAH levels in winter. Lannig et al. (2006) reported high mortalities, low index, and elevated peroxidation when oysters were exposed to elevated temperature and to Cd, while non significant effects were observed in the presence of only elevated temperature, suggesting a synergism between elevated temperatures and Cd stress on their energy metabolism. Thus, a synergism between PAH and temperature may induce a lipid peroxidation in oysters. In addition to that, MDA levels in the gills were positively correlated to PAH levels, suggesting that PAHs affect both the digestive gland and the gills, i.e. as seen by modulations of different enzyme activities, but more particularly the gills. Bivalves are filter-feeder organisms that can bioaccumulate contaminants from food, particles and seawater. The dissolve phase of contaminants is in direct contact with the gills. Food and sediment particles are also filtrated through gills but are then dispatched up to the

digestive gland to be metabolized (Livingstone 1993). Thus, effects observed in the gills suggest that the dissolve phase of PAHs exert a more important effect than food and particulate phases.

4.3. Relationships between contaminants and enzymes involved in immune defences

In the present study, catecholase and laccase levels were correlated to PCBs, OCPs but more particularly to PAHs levels. In the plasma, catecholase and laccase activities were generally positively correlated with PAHs, while catecholase and laccase activities in the gills, the mantle and the digestive gland were negatively correlated to PAHs. Since PAHs are lipophilic molecules, PAHs are likely to be present mainly in oyster tissues and thus, probably at higher concentrations than in the plasma. Thus, in the plasma, the presence of PAHs is likely to induce a stimulation of catecholase or laccase activities, while too high concentrations of PAHs in the tissues will induce an inhibition of these enzyme activities. Another possible explanation is that catecholases and laccases exert different sensitivities and/or play different roles depending on the tissue. Since POs, and more particularly laccases can catalyze oxidation of aromatics, such as PAHs, by an indirect mechanism involving the participation of an oxidative mediator (Dodor et al. 2004), catecholase and/or laccase in the plasma may enable a protection against bioaccumulated PAHs, and therefore, be a potential defence biomarker candidate in ecotoxicological studies. It is important to relate measurements of individual parameters to the overall function of the organism and to its reproductive success, growth, and viability (van der Oost et al. 2003). However, there is a lack of fundamental understanding of the activation and regulation of key factors of catecholase-type PO and laccase-type PO pathways. Indeed, an alteration in these pathways might be due to a specific toxicological response, but in the absence of adequate information to the contrary, might also be caused by the presence of certain pathogens or changes in regulatory factors associated to life stage.

In the immune system of molluscs, lysozyme is one of the most important bacteriolytic agents against several species of Gram-positive and Gram-negative bacteria (Cheng & Rodrick 1974). During phagocytosis, the release of lysosomal enzymes such as lysozymes participates in the inactivation of invading pathogens. Moreover, within bivalve hemocytes, lysosomes sequester, accumulate and metabolize a range of xenobiotics (Hagger et al. 2005). In the present study, lysozyme levels in the mantle and in the plasma were positively correlated to OCPs, suggesting that lysozyme play a role in OCP detoxification in *C. gigas*. It is important to notice that BOY and ML exhibited higher OCP levels than the other sites and that lysozyme activities were negatively correlated to OCP levels in oysters from these sites. The detoxification process in lysozymes is not effective if the storage capacity is exceeded (Moore et al. 1987). Thus, results in BOY and ML showing a reduction in lysozyme activity suggests an immunosuppression, resulting in lowered resistance to bacterial challenge and/or

impairment in the detoxification process, resulting in damage to the cell (Viarengo et al. 1985).

BOY and ML showed to be the most contaminated of the transplant sites. In BOY, PAH levels were positively correlated to GPx in the gills and catecholase in the plasma and negatively correlated to laccase in the gills. In ML, PAHs were positively correlated to SOD in the gills, and negatively correlated to catecholase levels in the gills, to GPx levels in the mantle and to lysozyme levels in the gills and in the digestive gland. These results suggest that, in these sites, PAHs can induce a stress and reduce the activity of enzymes implicated in defence mechanisms such as POs and lysozymes. In BOY, OCP levels were negatively correlated to lysozyme in the mantle, while positively correlated to CAT in the plasma. In ML, OCPs were positively correlated to MDA in the gills and to catecholase in the plasma ($r_s=0.94$, $p<0.01$, in both cases) and negatively correlated to catecholase in the gills, to lysozyme in the digestive gland and to GPx in the mantle ($r_s=-0.94$, $p<0.01$, in all cases). These results suggest that, in these sites, OCP can induce an oxidative stress that may lead at high concentrations to a lipid peroxidation and an inhibition in enzymes implicated in defence mechanisms in *C. gigas*, particularly lysozymes.

It is important to notice that enzyme activities in LP were generally high, particularly in summer, and that enzyme activities in C were generally low, particularly in winter. This result suggests that, in these sites, other environmental or physiological factors are susceptible to modulate enzyme activity responses. Thus, we decided to compare our results with the physiological metabolic status of oysters and to data from different environmental parameters collected by monitoring networks in France in order to better understand potential factors that modulate enzyme activities in *C. gigas*.

4.4. Relationships between enzyme activity responses, physiological metabolic status in oysters and environmental factors

Energy reserves are considered as biomarkers reflecting sublethal changes from a stressful xenobiotic exposure (Lagadic et al. 1994). In bivalves, energy is generally stored as glycogen until gametogenesis, when glycogen is converted to lipids (Gabbott 1975). Glycogen, can also decrease when organisms are exposed to high levels of contamination (Pellerin-Massicotte et al. 1994) but remains high when gametogenesis is delayed (Gauthier-Clerc et al. 2002). In *Ostreidae* the digestive gland is the main reserve organ of glycogen, supporting the development of the gonad (Gabbott & Head 1980). In summer, a decrease in glycogen contents in the digestive gland was observed in oysters from BOY, LP and C, while an increase in lipid and in protein contents were observed, suggesting that glycogen reserves were used in the synthesis of lipids and/or proteins (De La Parra et al. 2005). In LP, high glycogen contents were observed in comparison to oysters from B and to the other transplant sites, suggesting that glycogen reserves were not entirely used to synthesize lipids or proteins. Lipids play an important role in the physiology of bivalves and provide energy during winter growing. The digestive gland plays an intermediary role in transferring the

ingested lipids to other organs and constitutes an important organ of reserve of lipids (De La Parra et al. 2005), particularly when glycogen reserves are depleted (Beninger and Lucas, 1984). In addition to that, when carrying out Spearman rank correlations, glycogen contents in the digestive gland were negatively correlated to DDTs (and metabolites), but only in summer ($r_s=-0.68$, $p<0.01$). When pooling data from both seasons, lipids in the digestive gland were negatively correlated to PAHs ($r_s=-0.50$, $p<0.01$). These results suggest that contaminants may exert an effect on energetic reserves.

The condition index is often used to evaluate bivalve condition and is considered as one of the best indicators of gross body state for environmental studies (Hyötylänen et al. 2002). Thus, the determination of the condition index was used to estimate the adaptability of bivalves as a function of their environment. The condition index varies principally with the availability and/or the quality of the food (Mourgaud et al. 2002). Oysters exhibit cycle changes both in reproductive and somatic components as a consequence of the seasonality of environmental conditions (Ruiz et al. 1992). In the present study, higher condition index were observed in summer in comparison to winter. These results are in agreement with previous studies on mussels and oysters (Bodin et al. 2004, Soletchnik et al. 2006). In addition to that, the growth of juvenile oysters do not seem to have been disturbed by the transplantation, the difference in nutrient inputs and/or the levels of chemical contamination in the different sites in winter. The only important differences observed in environmental data collected from French monitoring networks were differences in phytoplankton abundance and species. In summer, the growth of juveniles was increased with transplantation in all sites and more particularly in C, suggesting that trophic quality is better at C than in the other sites.

It is important to notice that, even if the condition index was higher in C, enzyme activities were generally lower, in comparison to the other sites. This could be due to 1) better environmental conditions in C in comparison to the other sites or 2) an inhibition of enzyme activities due to an environmental stress. A decrease in lipid contents in the digestive gland and in ROS production in granulocytes have been observed in oysters exposed to *Alexandrium minutum*. The presence of the toxin-producing dinoflagellate, *Alexandrium sp.* was higher in C in comparison to the other sites. In addition to that, the presence of contaminants may also induce differences in condition index. In a study carried out in areas polluted by the Amoco Cadiz oil spill, the oyster growth was higher in the more heavily polluted sites (Maurin 1984). Thus, further studies between enzyme activities and the content in oysters of other contaminants such as heavy metals should be taken into consideration, in order to give an insight on the decrease in enzyme activities in this site.

5. Conclusion and perspectives

In conclusion, marked differences were observed in enzyme activities in oysters between sites and seasons, suggesting that persistent organic pollutants and PAHs can exert an effect on different enzyme activities implicated in defence mechanisms in the organism and therefore, exert a long term effect in defence capacities in sessile and filter-feeder organisms such as *C.*

gigas. Moreover, results suggest that catecholase-type PO and/or laccase-type PO would be interesting candidates for a non-specific biomarker of environmental stress because of its large range of response, relative to MDA. Further studies are required however to better understand the response of these potential biomarkers in the Pacific oyster as well as in other bivalves. In addition to that, we recommend to carry out multi-biological responses and multi-tissues analyses in order to give a better insight on the effect of contaminants on biological responses in *C. gigas*.

Acknowledgments

This study was supported by a PhD grant from the Conseil Général de la Charente-Maritime for A. Luna-Acosta. The Région Poitou-Charentes, the Région Aquitaine, the Conseil Général de la Charente-Maritime, the Conseil Général de la Gironde, the Agence de l'Eau Adour-Garonne are acknowledged for financial support for the project 'Défi Cadmium'. Authors wish to thank M. Baudrimont and D. Fichet for supporting this study through the 'Défi Cadmium' project. Authors acknowledge also R. Galois for his scientific advice for lipid and glycogen content analyses, C. Trichet, D. Vilday, M. Caille, J. Laheux and M. Pelmoine for their assistance during the study and the Ifremer networks ROCCH and RAZLEC, the 'Site Ifremer consacré à l'environnement littoral' and especially O. Le Moine, P. Soletchnik, S. Guesdon, P-G. Sauriau, P. Miramand and T. Guyot for data and references from Marennes-Oleron Bay.

References

- Auffret M, Duchemin M, Rousseau S, Boutet I, Tanguy A, Moraga D, Marhic A (2004) Monitoring of immunotoxic responses in oysters reared in areas contaminated by "Erika" oil spill. *Aquatic Living Resources* 17:297-302
- Bado-Nilles A, Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Le Floch S, Renault T (2008) Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicology in Vitro* 22:1610-1617
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Dizer H, Hansen PD (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Marine Environmental Research* 47:17-47
- Bodin N, Burgeot T, Stanisiere JY, Bocquene G, Menard D, Minier C, Boutet I, Amat A, Cherel Y, Budzinski H (2004) Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 138:411-427
- Borg D, Schaich K (1983) Cytotoxicity from coupled redox cycling of autoxidizing xenobiotics and metals. *Israel Journal of Chemistry* 24:38-53
- Boutier B, Chiffolleau J-F, Gonzalez J-L, Lazure P, Auger D, Truquet I (2000) Influence of the Gironde estuary outputs on cadmium concentrations in the waters: consequences on the Marennes-Oléron bay (France). *Oceanologica Acta* 23:745-757

- Brosse L (2003) Caractérisation des habitats des juvéniles d'esturgeon européen, *Acipenser sturio*, dans l'estuaire de la Gironde : relations trophiques, hiérarchisation et vulnérabilité des habitats. Université de Toulouse III
- Burgeot T, Quirion S, Quiniou F, Knoery J, Soletchnik P, Gagnaire B, Renault T, Osada M, Geret F, Communal P (2005) Environmental stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during gametogenesis : role of herbicides? PRIMO, 13^{ème} édition, Alessandria
- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *The Science of the Total Environment* 247:295-311
- Cheney D, MacDonald B, Elston R (2000) Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington. *Journal of Shellfish Research* 19:353-359
- Cheng T, Rodrick J (1974) Identification and characterization of lysozyme from the hemolymph of the soft-shelled clam *Mya arenaria*. *Biological Bulletin* 147:311-320
- Cheung CCC, Siu WHL, Richardson BJ, De Luca-Abbott SB, Lam PKS (2004) Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Environmental Pollution* 128:393-403
- De La Parra A, García O, San Juan F (2005) Seasonal variations on the biochemical composition and lipid classes of the gonadal and storage tissues of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1794) in relation to the gametogenic cycle. *Journal of Shellfish Research* 24:457-467
- Di Giulio RT, Washburn PC, Wenning RJ, Winston GW, Jewell CS (1989) Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. Wiley Periodicals, Inc., p 1103-1123
- Dixon DR, Wilson JT (2000) Genetics and marine pollution. *Hydrobiologia* 420:29-43
- Dodor DE, Hwang H-M, Ekunwe SIN (2004) Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 35:210-217
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356
- Eggert C, Temp U, Eriksson K (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 62:1151-1158
- Espin J, Morales M, Varon R, Tudela J, Garcia-Canovas F (1995) A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry* 231:237-246
- FAO (2010) Aquaculture Production: Quantities 1950-2008. Fishstat Plus
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley H (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226:497-509
- Fossati P, Prencipe L, Berti G (1980) Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clinical Chemistry* 26:227-231
- Gabbott P (1975) Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In: Barnes HB (ed) *European Marine Biology Symposia*, Aberdeen
- Gabbott PA, Head EJH (1980) Seasonal changes in the specific activities of the pentose phosphate pathway enzymes, G6PDH and 6PGDH and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in the

- bivalves *Mytilus edulis*, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. Comparative Biochemistry and Physiology B 66:279-284
- Gagnaire B, Gay M, Huvet A, Daniel J, Saulnier D, Renault T (2007) Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *In vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquatic Toxicology 84:92-102
- Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert M, Nicolas JL (2007) Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Microbial Ecology 53:187-196
- Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Blaise C, Gagné F (2002) Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors? Comparative Biochemistry and Physiology C 131:457-467
- Geffard A, Amiard JC, Amiard-Triquet C (2002) Kinetics of metal elimination in oysters from a contaminated estuary. Comparative Biochemistry and Physiology C 131:281-293
- Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan J, Chaudiere J (1998) Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. Chemical Research in Toxicology 11:1176-1183
- Gunther AJ, Davis JA, Hardin DD, Gold J, Bell D, Crick JR, Scelfo GM, Sericano J, Stephenson M (1999) Long-term bioaccumulation monitoring with transplanted bivalves in the San Francisco estuary. Marine Pollution Bulletin 38:170-181
- Hagger JA, Depledge MH, Galloway TS (2005) Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. Marine Pollution Bulletin 51:811-816
- Head IM, Swannell RPJ (1999) Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. Current Opinion in Biotechnology 10:234-239
- Hyötyläinen T, Karels A, Oikari A (2002) Assessment of bioavailability and effects of chemicals due to remediation actions with caging mussels (*Anodonta anatina*) at a creosote-contaminated lake sediment site. Water Research 36:4497-4504
- Ifremer (2008) Qualité du milieu marin littoral - Départements : Vendée sud et Charente-Maritime
- Ifremer (2009) Qualité du milieu marin littoral - Départements : Vendée sud et Charente-Maritime
- Johnston SA (1981) Estuarine dredge and fill activities: A review of impacts. Environmental Management 5:427-440
- Kappus H (1985) Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. Academic Press, London
- Krishnakumar PK, Casillas E, Varanasi U (1995) Effects of chemical contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington. II. Cytochemical detection of subcellular changes in digestive cells. Marine Biology 124:251-259
- Lacoste A, Jalabert F, Malham SK, Cuffe A, Poulet SA (2001) Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. General and Comparative Endocrinology 67:2304-2309
- Lagadic L, Caquet T, Ramade F (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. Ecotoxicology 3:193-208
- Lannig G, Flores JF, Sokolova IM (2006) Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. Aquatic Toxicology 79:278-287

- Livingstone D, Garcia Martinez P, Michel X, Ribera D, Winston G (1990) Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L. and other molluscs. *Functional Ecology* 4:415-424
- Livingstone DR (1993) Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *57:195-211*
- Luna-Acosta A, Rosenfeld E, Amari M, Fruitier-Arnaudin I, Bustamante P, Thomas-Guyon H (2010) First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology* 28:719-726
- Manduzio H, Monsinjon T, Galap C, Leboulenger F, Rocher B (2004) Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquatic Toxicology* 70:83-93
- Maurin C (1984) Accidental oil spills: biological and ecological consequences of accidents in French waters on commercially exploitable living resources. In: Sheehan P, Miller D, Butler G, Bourdeau P (eds) *Pollutants at the Ecosystem Level, SCOPE*. John Wiley and Sons, p 311-363
- Meador J (2003) Bioaccumulation of PAHs in marine invertebrates. In: Douben P (ed) *PAHs: An ecological perspective*. John Wiley and Sons, NY, p 392
- Miramand P, Guyot T, Pigeot J (2003) Sources et impacts potentiels des micropolluants chimiques sur un écosystème littoral exploité : L'exemple des côtes des Charente-Maritime. *Journal de Physique IV France* 108:3-6
- Moore M, Pipe R, Farrar S, Thompson S, Donkin P (1987) Lysosomal and microsomal responses to oil-derived hydrocarbons in *Littorina littorea*. In: Capuzzo J, Kester D (eds) *Oceanic processes in marine pollution, Vol 1*. Robert E Krieger Publishing Company, Malabar, Florida, p 89-96
- Mourgaud Y, Martinez E, Geffard A, Andral B, Stanisiere J-Y, Amiard J-C (2002) Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. *Biomarkers* 7:479-490
- Munaron D (2004) Study of herbicides and nutrients inputs by the Charente river to the coast and modelling of the dispersion of atrazine in the Marennes-Oléron bay.
- Munaron D, Dubernet J, Delmas F, Stanisiere J, Scribe P (2006) Assessment of the quantities of herbicides and nutrients brought down by the river Charente to the coast and modelling of the dispersion of atrazine in the Marennes-Oleron bay. *Cahiers de Biologie Marine (Station Biologique de Roscoff)* 47:85-92
- Neumann N, Stafford J, Barreda D, Ainsworth A, Belosevic M (2001) Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental and Comparative Immunology* 25:807-825
- Orbea A, Cajaraville MP (2006) Peroxisome proliferation and antioxidant enzymes in transplanted mussels of four basque estuaries with different levels of polycyclic aromatic hydrocarbon and polychlorinated biphenyl pollution. *Wiley Periodicals, Inc.*, p 1616-1626
- Orbea A, Ortiz-Zarragoitia M, Solé M, Porte C, Cajaraville MP (2002) Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology* 58:75-98
- Paglia D, Valentine W (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 70:158-169

- Pellerin-Massicotte J, Martineu P, Desrosiers G, Caron A, Scaps P (1994) Seasonal variability in biochemical composition of the polychaete *Nereis virens* (Sars) in two tidal flats with different geographic orientations. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 107:509-516
- Perdue J, Beattie J, Chew K (1981) Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *Journal of Shellfish Research* 1:9-16
- Porte C, Albaigés J (1993) Bioaccumulation patterns of PCB congeners in bivalves, crustaceans and fishes from the Mediterranean coast. Implications in biomonitoring studies. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 26:273-281
- Porte C, Sole M, Albaigés J, Livingstone DR (1991) Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus sp.* to organic pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 100:183-186
- Powell E, Hofmann E, Klinck J, Ray S (1992) Modeling oyster populations I. A commentary on filtration rate. Is faster always better? *Journal of Shellfish Research* 11:387-398
- Readman JW, Fillmann G, Tolosa I, Bartocci J, Villeneuve JP, Catinni C, Mee LD (2002) Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin* 44:48-62
- Richardson BJ, Mak E, De Luca-Abbott SB, Martin M, McClellan K, Lam PKS (2008) Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels "integrate" biomarker responses? *Marine Pollution Bulletin* 57:503-514
- Rodríguez-Ariza A, Martínez-Lara E, Pascual P, Pedrajas JR, Abril N, Dorado G, Toribio F, Bárcena JA, Peinado J, Pueyo C, López-Barea J (1993) Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Science of the Total Environment* 134:109-116
- Ruiz C, Martínez D, Mosquera G, Abad M, Sánchez JL (1992) Seasonal variations in condition, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Marine Biology* 112:67-74
- Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B, Klenk D (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150:76-85
- Söderhäll K, Cerenius L (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10:23-28
- Sole M (2000) Assessment of the results of chemical analyses combined with the biological effects of organic pollution on mussels. *Trends in Analytical Chemistry* 19:1-9
- Sole M, Porte C, Albaigés J (1995) The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. *Science of the Total Environment* 159:147-153
- Soletchnik P, Faury N, Gouletquer P (2006) Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron bay (France). *Aquaculture* 252:328-338
- Soletchnik P, Le Moine O, Faury N, Razet D, Geairon P, Gouletquer P (1999) Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron: étude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d'informations géographiques (SIG). *Aquatic Living Resources* 12:131-143
- Stabili L, Pagliara P (2009) Effect of zinc on lysozyme-like activity of the seastar *Marthasterias glacialis* (Echinodermata, Asteroidea) mucus. *Journal of Invertebrate Pathology* 100:189-192
- Tanguy A, Boutet I, Laroche J, Moraga D (2005) Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS Journal* 272:390-403

- Therond P, Gerbaud P, Dimon S, Anderson WB, Evain-Brion D, Raynaud F (1996) Antioxidant enzymes in psoriatic fibroblasts and erythrocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 106:1325-1331
- Thiagarajan R, Gopalakrishnan S, Thilagam H (2006) Immunomodulation in the marine green mussel *Perna viridis* exposed to sub-lethal concentrations of Cu and Hg. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51:392-399
- Thompson S, Budzinski H (2000) Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in environmental biological samples using focused microwave-assisted extraction. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 76:49 - 60
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13:57-149
- Verlecar XN, Jena KB, Chainy GBN (2007) Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chemico-Biological Interactions* 167:219-226
- Viarengo A, Moore MN, Pertica M, Mancinelli G, Zanicchi G, Pipe RK (1985) Detoxification of copper in the cells of the digestive gland of mussel: The role of lysosomes and thioneins. *Science of the Total Environment* 44:135-145
- Winston GW (1991) Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 100:173-176
- Zar J (1984) *Biostatistical analysis*, Prentice-Hall, New Jersey

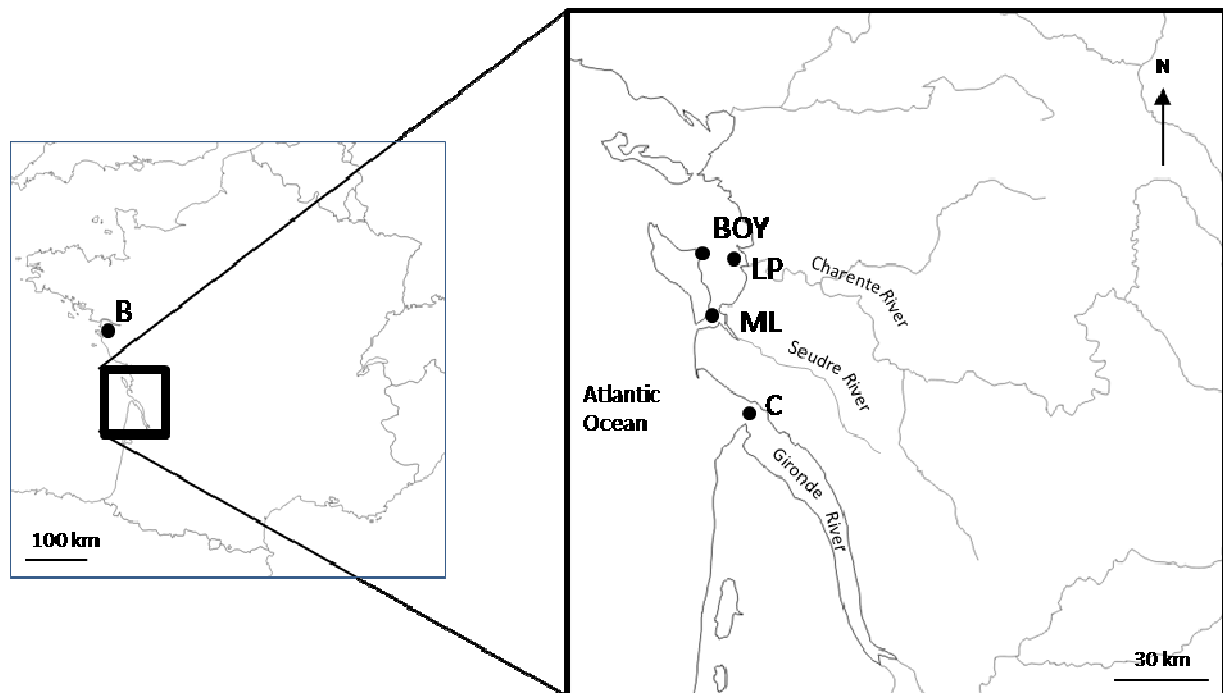


Figure 1 Estuarine sampling areas in French Atlantic coast: a. localization of reference (R) and transplant (T) sites in France; **b.** localization of transplant sites Boyard (BOY), Les Palles (LP), Mus du Loup (ML) in the Marennes-Oleron Bay and Cordouan (C) in the Gironde Estuary.

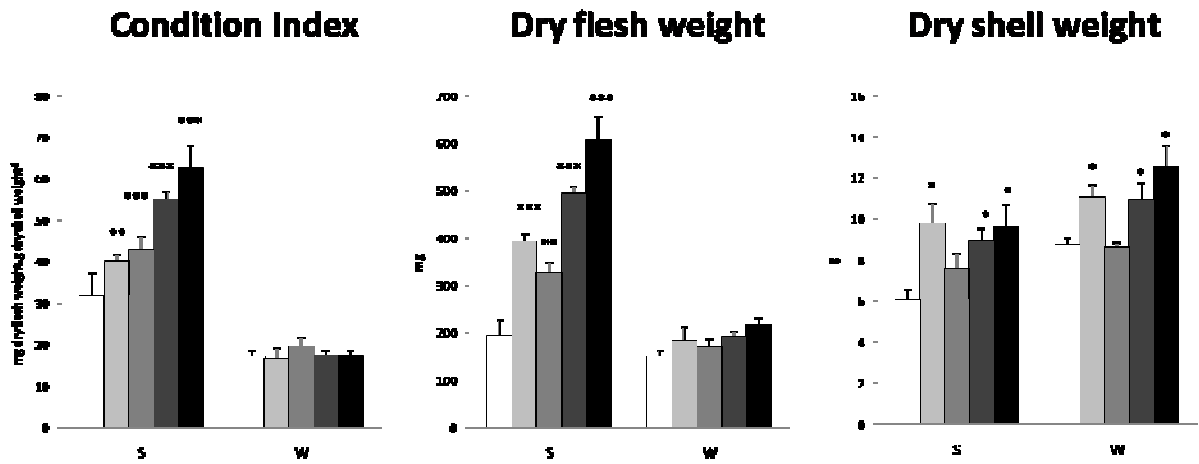


Figure 2 Condition index (a), dry flesh weight (b) and dry shell weight (c) in *C. gigas* from reference, i.e. Bouin (B, white bars), and transplant sites, i.e. Boyard (BOY, light grey bars), Les Palles (LP, medium grey bars), Mus du Loup (ML, dark grey bars) and Cordouan (C, black bars) in the summer (S) and in the winter (W). Data are expressed as mean \pm SD. For clarity of results, only significant differences between reference and transplant sites are shown; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Superscript letters indicate significant ($p < 0.05$) differences between B samples from summer and winter.

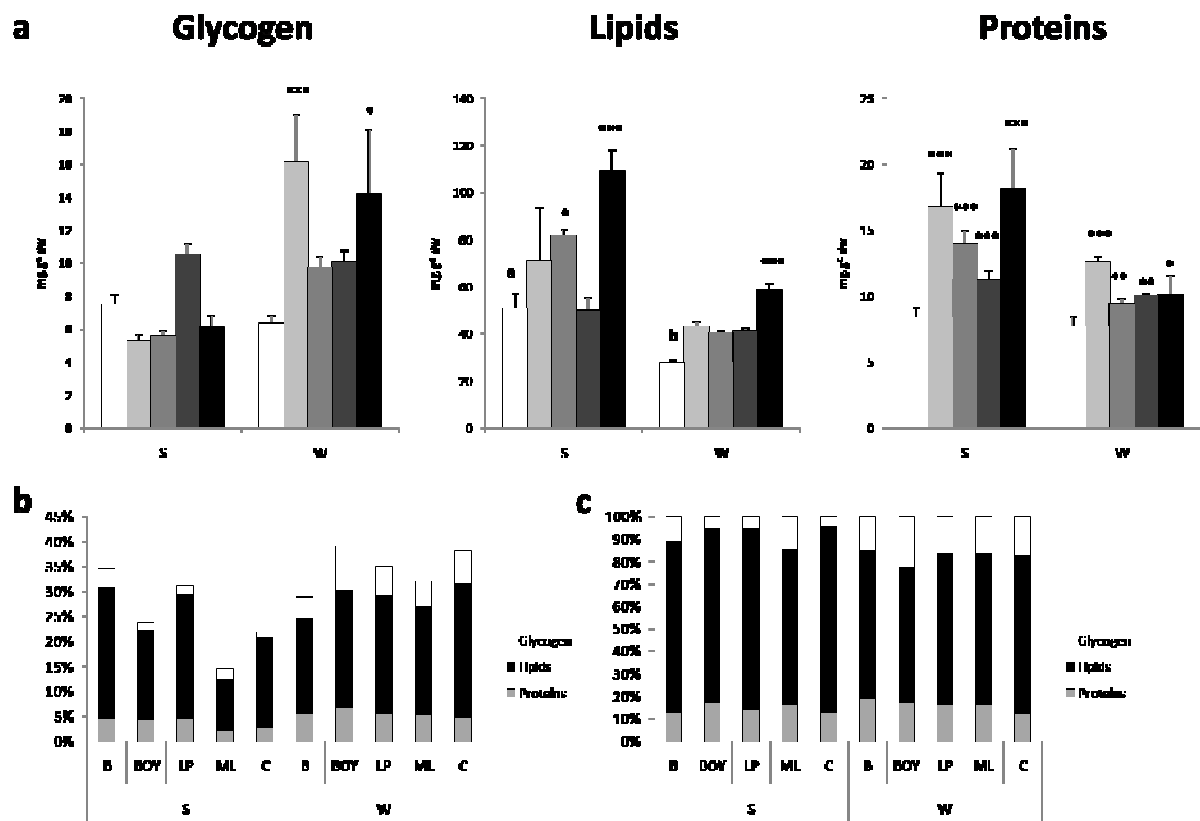


Figure 3 Energetic reserves (glycogen, lipids, proteins) in the digestive gland of *C. gigas* from reference, i.e. Bouin (B, white bars), and transplant sites, i.e. Boyard (BOY, light grey bars), Les Palles (LP, medium grey bars), Mus du Loup (ML, dark grey bars) and Cordouan (C, black bars) in the summer (S) and in the winter (W; Fig. 10a). Data are expressed as **mean \pm SD**. For clarity of results, only significant differences between reference and transplant sites are shown; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Superscript letters indicate significant ($p < 0.05$) differences between B samples from summer and winter. b. Levels of energetic reserves are expressed in percentage (%) relative to the total flesh dry weight. c. Levels of energetic reserves (glycogen, lipids, proteins) are presented in percentage (%) relative to the total fresh dry weight, with the total fresh dry weight standardized for all sites and seasons to 100%.

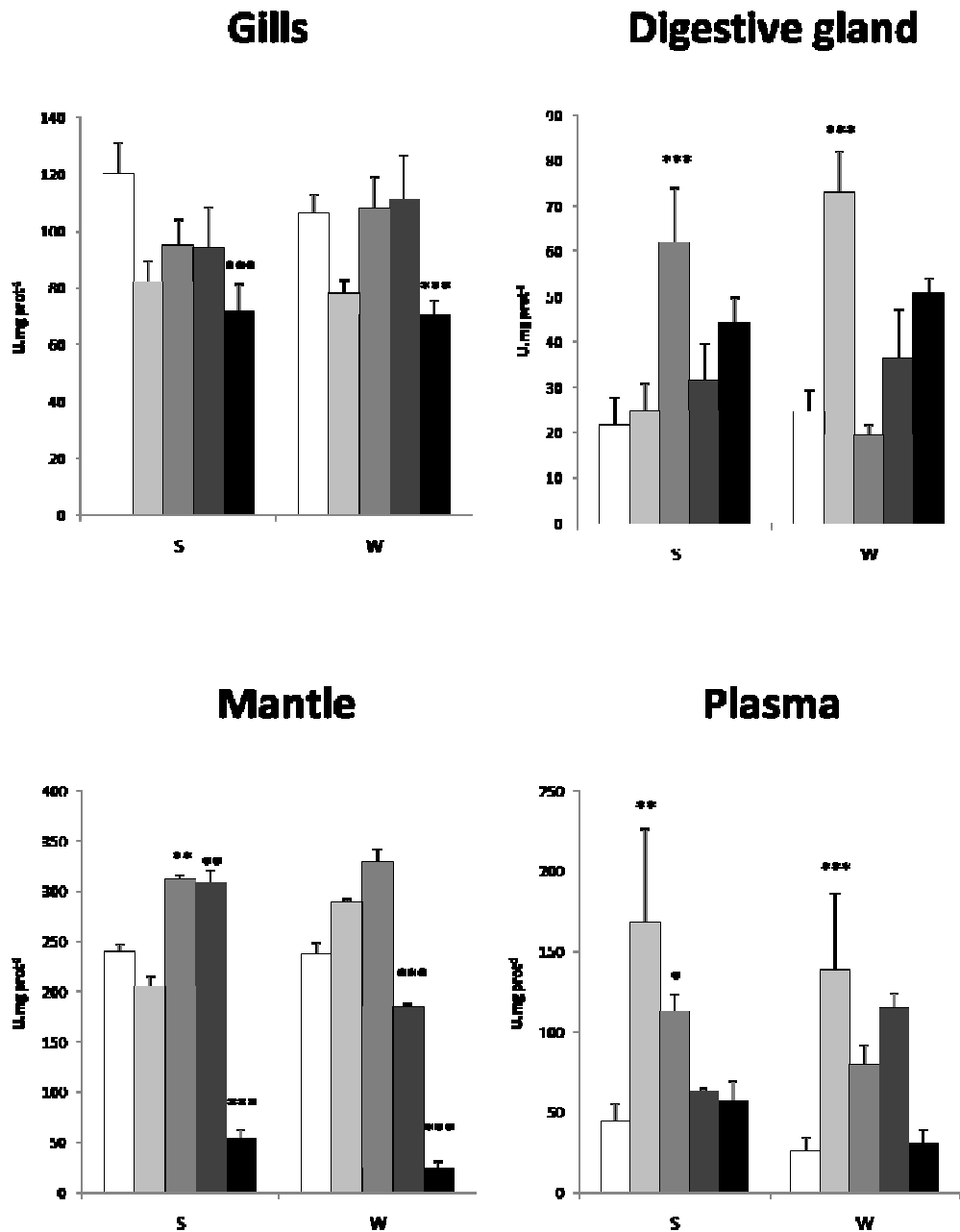


Figure 4 Superoxide (SOD) dismutase activity in the gills (a), the digestive gland (b), the mantle (c) and the plasma (d) in *C. gigas* from reference, i.e. Bouin (B, white bars), and transplant sites, i.e. Boyard (BOY, light grey bars), Les Palles (LP, medium grey bars), Mus du Loup (ML, dark grey bars) and Cordouan (C, black bars) in the summer (S) and in the winter (W). Data are expressed as mean \pm SD. For clarity of results, only significant differences between reference and transplant sites are shown; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

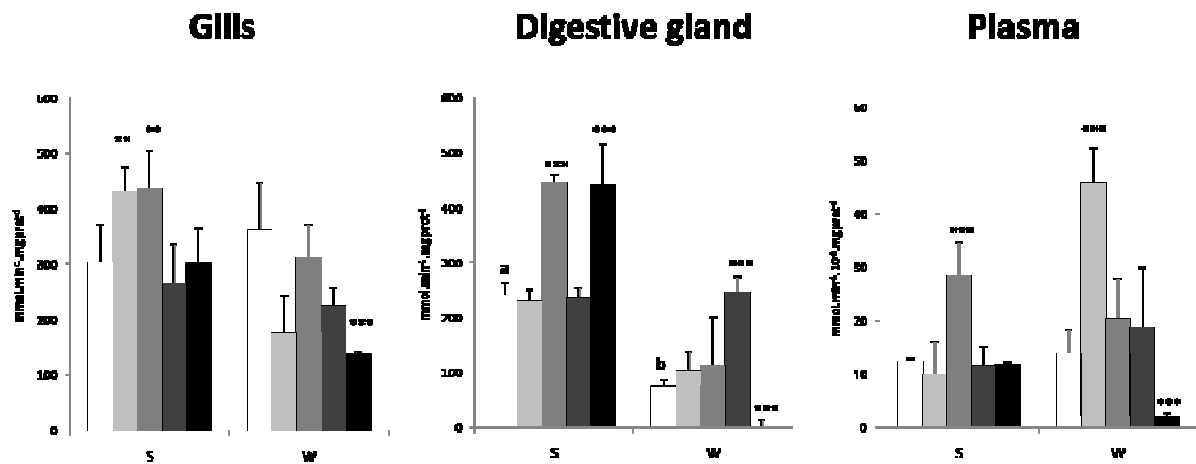


Figure 5 Catalase (CAT) activity in the gills (a), the digestive gland (b), the mantle (c) and the plasma (d) in *C. gigas* from reference, i.e. Bouin (B, white bars), and transplant sites, i.e. Boyard (BOY, light grey bars), Les Palles (LP, medium grey bars), Mus du Loup (ML, dark grey bars) and Cordouan (C, black bars) in the summer (S) and in the winter (W). Data are expressed as mean \pm SD. For clarity of results, only significant differences between reference and transplant sites are shown; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Superscript letters indicate significant ($p < 0.05$) differences between B samples from summer and winter.

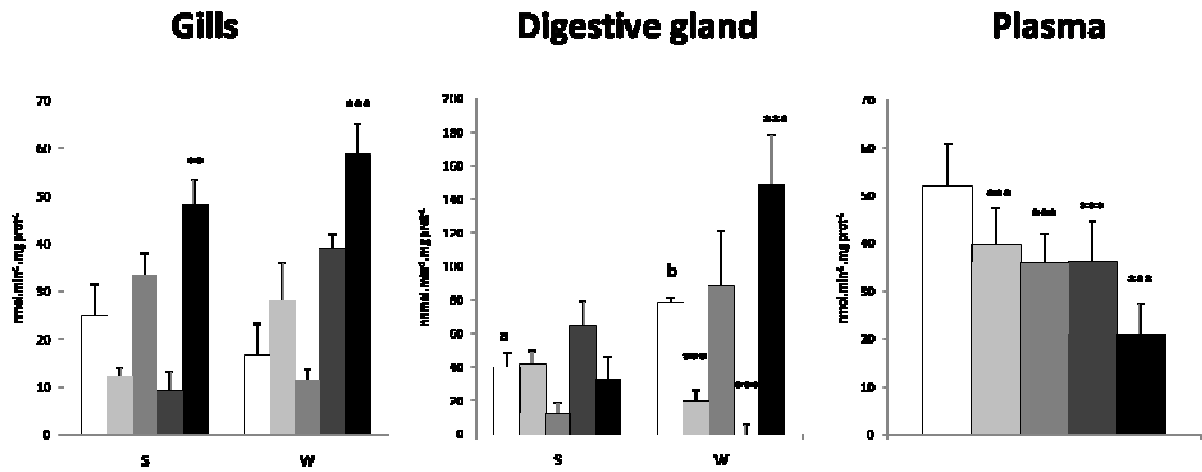


Figure 6 Glutathione peroxidase (GPx) activity in the gills (a), the digestive gland (b) and the plasma (c) in *C. gigas* from reference, i.e. Bouin (B, white bars), and transplant sites, i.e. Boyard (BOY, light grey bars), Les Palles (LP, medium grey bars), Mus du Loup (ML, dark grey bars) and Cordouan (C, black bars) in the summer (S) and in the winter (W). Data are expressed as mean \pm SD. For clarity of results, only significant differences between reference and transplant sites are shown; ** <math>p<0.01</math>, *** <math>p<0.001</math>. Superscript letters indicate significant (<math>p<0.05</math>) differences between B samples from summer and winter.

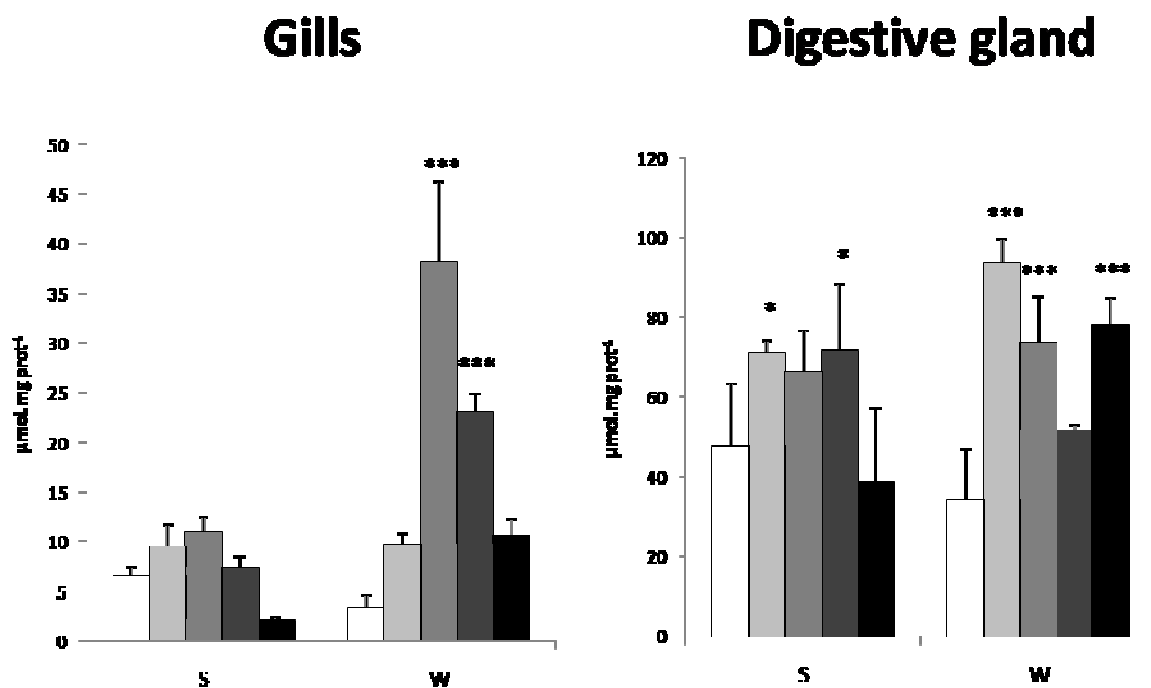


Figure 7 Malondialdehyde (MDA) levels in the gills (a) and the digestive gland (b) in *C. gigas* from reference, i.e. Bouin (B, white bars), and transplant sites, i.e. Boyard (BOY, light grey bars), Les Palles (LP, medium grey bars), Mus du Loup (ML, dark grey bars) and Cordouan (C, black bars) in the summer (S) and in the winter (W). Data are expressed as mean \pm SD. For clarity of results, only significant differences between reference and transplant sites are shown; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

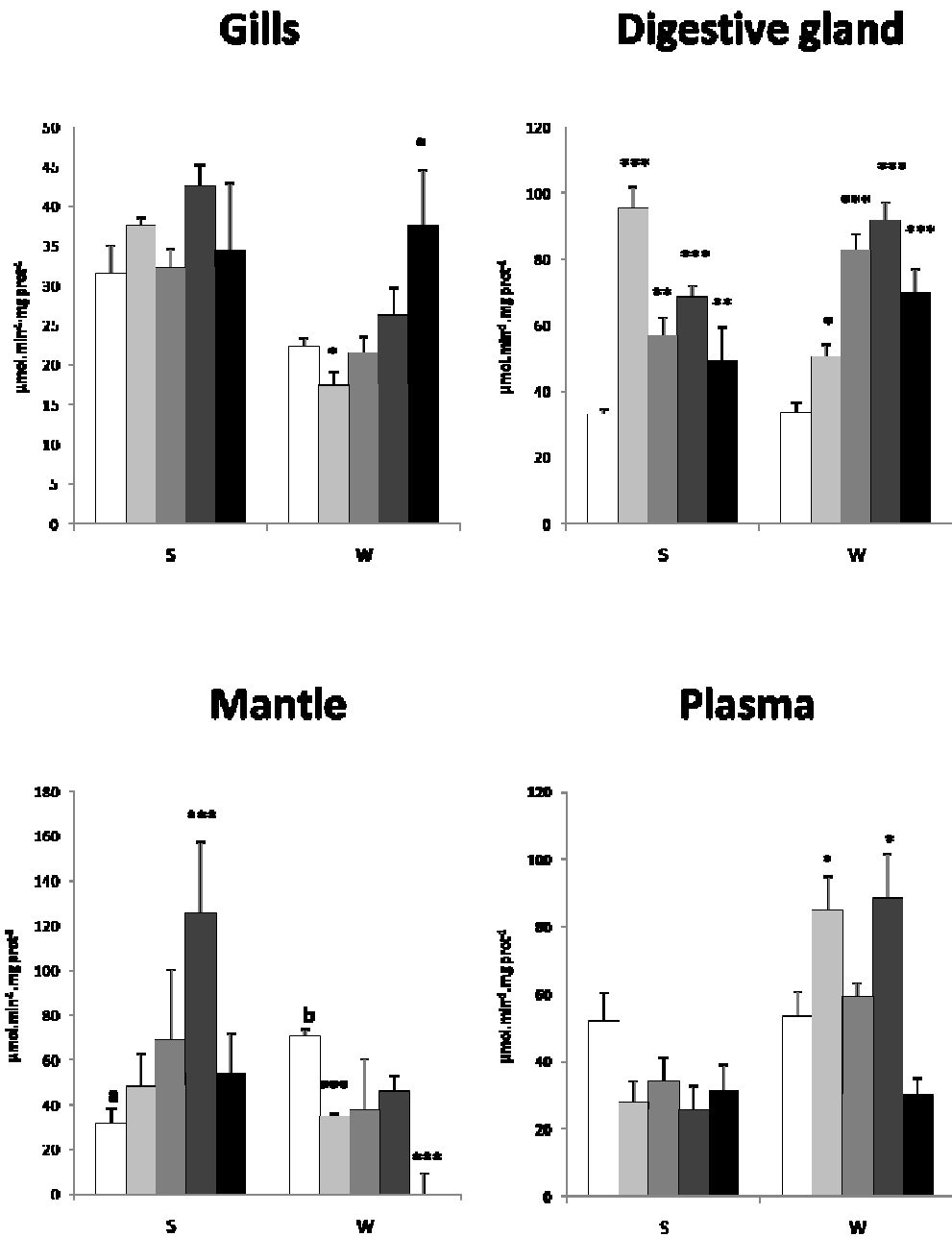


Figure 8 Catecholase-type phenoloxidase activity in the gills (a) and the digestive gland (b) in *C. gigas* from reference, i.e. Bouin (B, white bars), and transplant sites, i.e. Boyard (BOY, light grey bars), Les Palles (LP, medium grey bars), Mus du Loup (ML, dark grey bars) and Cordouan (C, black bars) in the summer (S) and in the winter (W). Data are expressed as mean \pm SD. For clarity of results, only significant differences between reference and transplant sites are shown; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Superscript letters indicate significant ($p < 0.05$) differences between B samples from summer and winter.

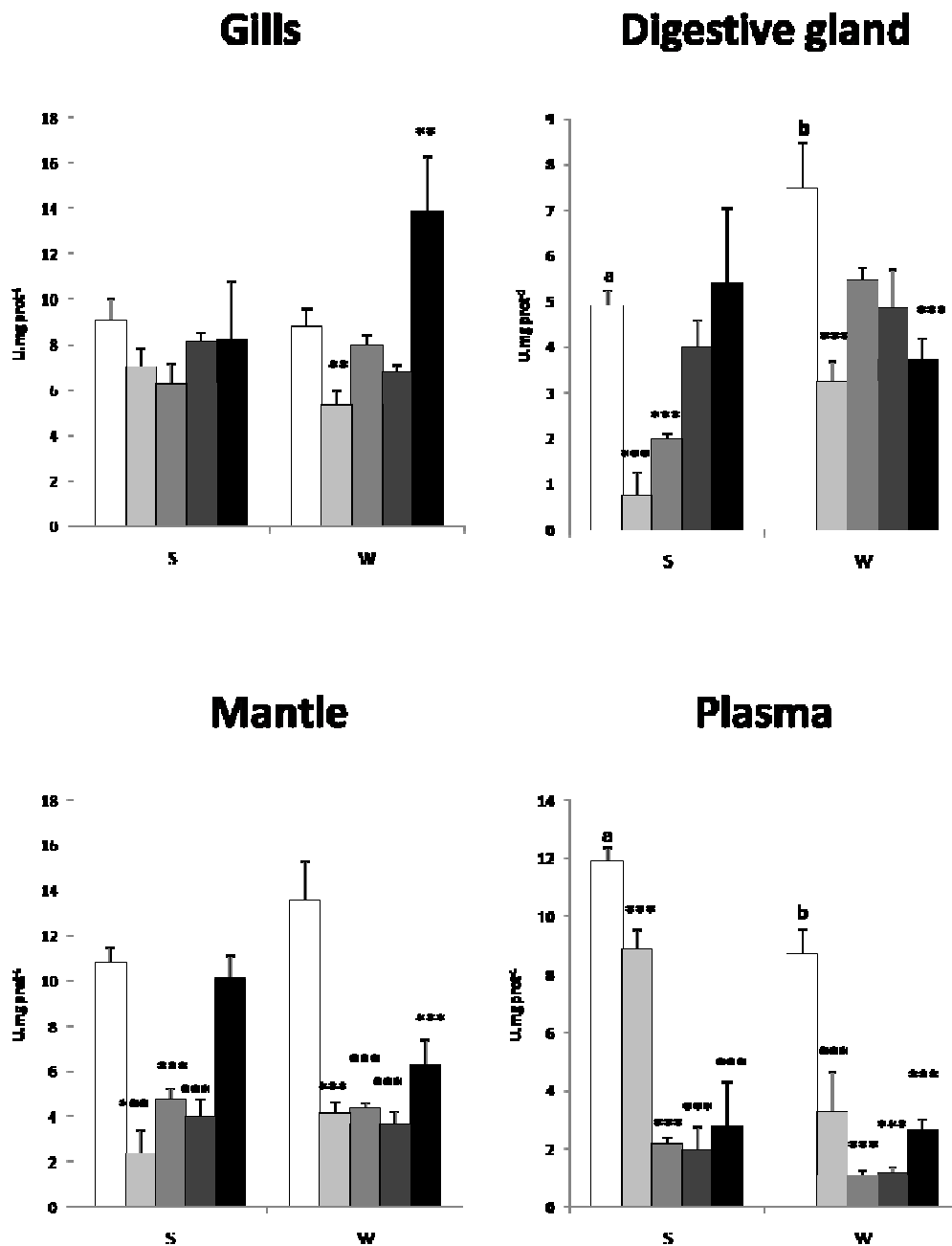


Figure 9 Laccase-type phenoloxidase activity in the gills (a) and the digestive gland (b) in *C. gigas* from reference, i.e. Bouin (B, white bars), and transplant sites, i.e. Boyard (BOY, light grey bars), Les Palles (LP, medium grey bars), Mus du Loup (ML, dark grey bars) and Cordouan (C, black bars) in the summer (S) and in the winter (W). Data are expressed as mean \pm SD. For clarity of results, only significant differences between reference and transplant sites are shown; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

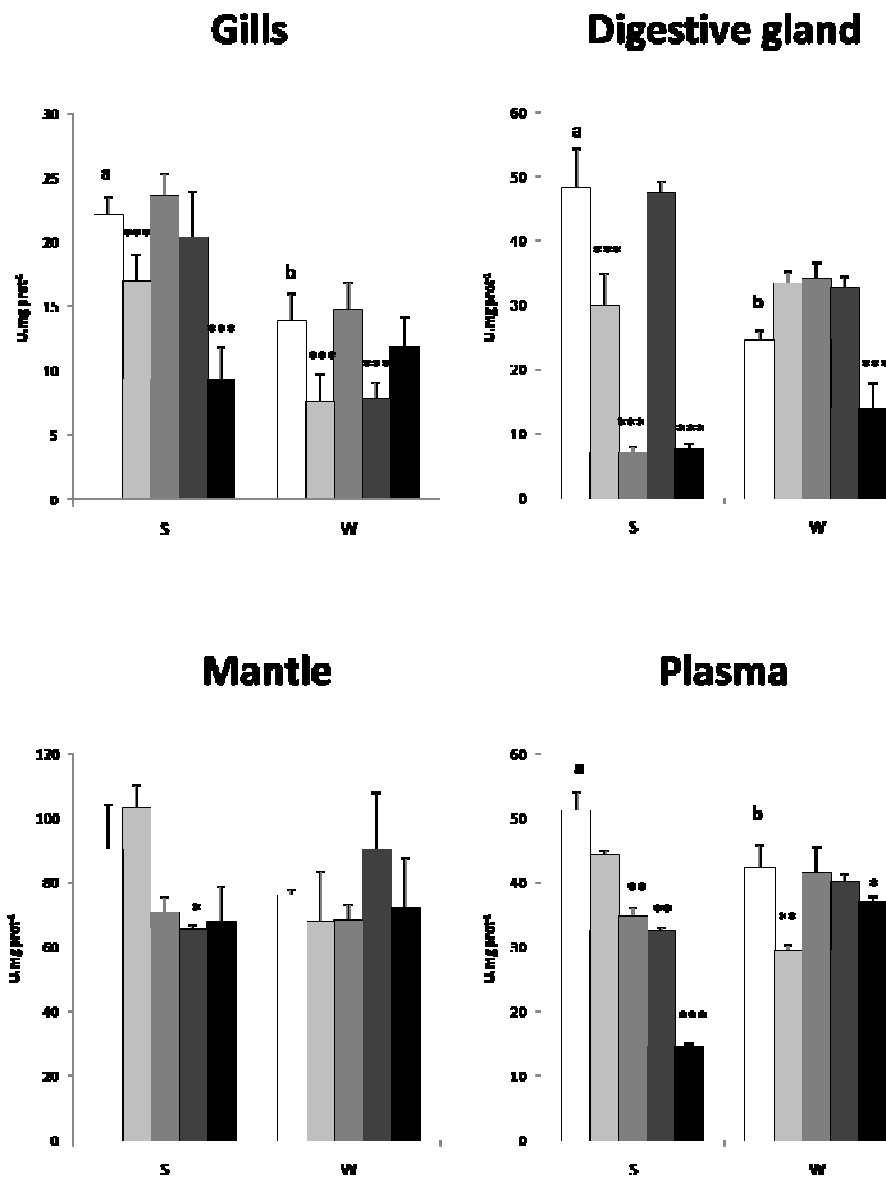


Figure 10 Lysozyme activity in the gills (a) and the digestive gland (b) in *C. gigas* from reference, i.e. Bouin (B, white bars), and transplant sites, i.e. Boyard (BOY, light grey bars), Les Palles (LP, medium grey bars), Mus du Loup (ML, dark grey bars) and Cordouan (C, black bars) in the summer (S) and in the winter (W). Data are expressed as mean \pm SD. For clarity of results, only significant differences between reference and transplant sites are shown; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Superscript letters indicate significant ($p < 0.05$) differences between B samples from summer and winter.

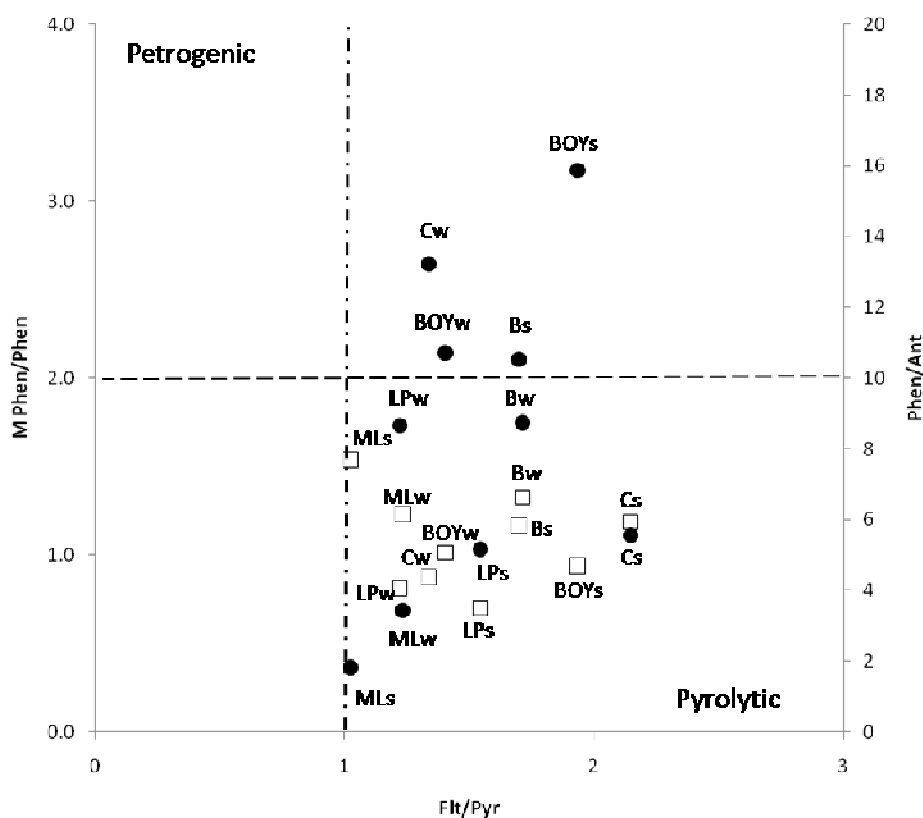


Figure 11 Chemical indices to discriminate petrogenic/pyrolytic aromatic hydrocarbons. Phen/Anth, phenanthrene/anthracene ratio, Flt/P, fluoranthene/pyrene ratio, MPhen/Phen methyl phenanthrene/phenanthrene ratio, B: Bouin; BOY: Boyard, LP: Les Palles, ML: Mus du Loup; C: Cordouan; s: summer; w: winter. MPhen/Phen in squares; Phen/Ant in circles. Continuous dotted line corresponds to the limit between petrogenic and pyrolytic sources according to the ratios MPhen/Phen and Phen/Ant; discontinuous dotted line corresponds to the limit between petrogenic and pyrolytic sources according to the ratio Flt/Pyr.

Table 1 Polyaromatic hydrocarbon (PAH) content in oyster's flesh (in $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dry weight) at two seasons after 3 months transplantation.

PAHs (parents and alkylated)	No. of aromatic rings	Molecular weight (g.mol^{-1})	Concentration ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ dw)									
			Summer					Winter				
			B	BOY	LP	ML	C	B	BOY	LP	ML	C
Naphthalene	3	128	7.5±0.3	4.9±1.4	3.0±1.1	4.8±0.2	5.7±3.3	2.9±0.9	3.2±2.0	3.8±1.5	4.0±0.2	3.2±0.6
C1-Naphthalene	3	143	4.2±0.5	4.5±2.0	3.8±2.5	4.8±0.5	5.1±2.6	2.9±0.7	4.9±2.7	3.6±0.8	3.0±0.7	3.5±0.3
C2-Naphthalene	3	158	6.6±0.4	8.1±4.4	7.3±5.6	8.7±0.7	9.7±5.5	5.2±0.9	8.4±4.4	7.2±1.7	5.7±1.4	6.5±0.5
Acenaphthylene	3	155	0.3±0.3	0.3±0.1	0.3±0.0	0.3±0.1	0.3±0.1	0.5±0.1	0.6±0.1	0.2±0.3	0.5±0.1	0.5±0.1
Acenaphthene	3	154	3.3±0.0	2.1±0.2	2.3±0.1	0.9±0.1	1.6±0.3	2.3±0.6	3.3±1.3	2.8±0.4	4.5±0.2	4.7±1.3
Fluorene	3	166	3.3±0.4	2.9±0.2	3.0±1.0	0.5±0.1	1.9±0.9	2.5±0.8	2.9±0.8	1.6±1.0	1.6±0.2	2.2±0.7
Phenanthrene	3	178	19.6±0.8	16.4±0.1	12.5±1.5	2.1±0.0	8.0±5.5	20.5±8.7	21.4±4.8	20.1±6.4	8.2±3.2	10.2±1.8
C1-+C9-Phenanthrene+C1-Anthracene	3	208-238	7.1±0.4	6.4±0.2	4.7±1.7	1.4±0.3	3.5±3.8	10.8±4.5	7.8±1.1	7.4±2.1	4.4±0.8	4.9±1.5
C2-+C3-Phenanthrene	3	223-238	12.5±5.3	8.2±1.4	5.5±1.1	1.8±0.1	6.0±2.0	16.5±10.0	11.1±5.0	8.9±2.2	5.6±0.3	5.4±1.1
Anthracene	3	178	1.9±0.1	1.0±0.1	2.4±0.3	1.2±0.1	1.4±0.7	2.4±1.9	2.0±1.0	2.3±0.4	2.4±0.1	0.8±0.4
C2-Anthracene	3	193	0.6±0.2	1.9±1.4	1.5±0.6	0.6±0.2	1.0±0.4	0.1±0.1	0.9±0.0	0.8±0.6	0.4±0.0	1.1±0.5
Dibenzothiophene	3	184	1.6±0.3	1.0±0.2	0.9±0.3	nd	0.9±0.4	2.2±0.7	1.6±0.3	0.8±0.8	0.5±0.2	0.5±0.1
Fluoranthene	4	202	7.9±0.3	12.0±1.6	21.4±0.3	6.3±0.4	6.1±2.6	15.1±2.1	33±5.9	20.6±3	21.3±4.7	16.1±2.4
Pyrene	4	202	4.7±0.4	6.2±0.5	13.9±2	6.1±0.5	2.8±1.4	8.8±0.8	23.6±2.9	16.9±1.2	17.3±4.1	12±1.6
Benzo(a)anthracene	4	228	2.2±0.6	6.1±1.7	10.2±4.1	3.9±1.1	2.9±0.9	3.9±0.3	13.9±2.2	9.9±0.7	9.2±4.3	3.1±0.6
Triphenylene+Chrysene	4	228	4.2±0.4	8.9±2.1	13.1±3.5	5.8±0.7	3.4±1.1	8.2±1.4	21.1±0.6	15.9±0.9	18.9±1.3	8.7±1.4
Benzo(b)naptho(2,1-d)thiophene	4	234	0.7±0	1.3±0.1	3.6±0.8	0.9±0.2	0.4±0.2	1.1±0.7	3.3±0.3	3±0.7	3.1±0.7	1.2±0.2
Benzo(b+k+j)fluoranthene	5	252	15.7±0.8	22.5±3.1	36.6±4.4	14.6±3.3	6.8±1.4	19.8±2.9	21±19.7	36±3	39.5±2.9	13.3±2.4
Benzo(e)pyrene	5	252	8.0±0.9	10.9±1.6	15.0±2.5	6.5±1.5	3.5±0.2	8.4±1.5	15.5±2.0	13.8±2.0	17.7±0.4	7.8±1.7
Benzo(a)pyrene	5	252	2.4±0.4	2.5±0.3	5.0±1.6	1.8±0.5	1.3±0.6	2.7±0.4	9.5±3.0	7.6±0.2	7.0±5.3	1.6±0.3
Perylene	5	252	6.9±1.1	4.5±0	6.3±0.2	3.4±0.6	5.3±0.7	8.3±0.8	5.5±0.3	4.8±0.8	4.6±2	6.8±0.3
Benzo(g,h,i)perylene	5	276	4.3±0.4	2.9±0.7	5.6±1.2	2.1±0.7	1.1±0.1	4.5±1.6	9.1±0.5	6.7±0.3	8.9±3.7	2.5±0.5
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	5	276	2.8±0.2	3±0.2	8.2±2.0	2.0±0.8	1.3±0.5	4.6±1.1	10.1±0.7	8.2±0.3	9.6±4.8	2.5±0.2
Dibenzo(a,h)anthracene+dibenzo(a,c)anthracen	5	278	0.3±0.3	0.5±0.1	2.6±1.0	0.4±0.1	0.2±0.0	1.2±0.4	1.8±0.1	1.7±0.2	2.4±1.0	0.9±0.2
Σ PAH			129±6	139±19 ^{a,b}	189±25 ^a	81±11 ^b	80±32 ^{a,b}	155±25	236±43 ^{*, a}	205±9 ^a	200±40 ^a	120±16 ^b

B: Bouin; BOY: Boyard; LP: Les Palles; ML: Mus du Loup; C: Cordouan; dw: dry weight; nd: non detected; * significant differences ($p < 0.05$) with B; superscript letters indicate significant ($p < 0.05$) differences between transplant sites.

Table 2 Polychlorobiphenyl (PCB) and polybromodiphenyl ether (PBDE) contents in oyster's flesh (in $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dry weight) at two seasons after 3 months transplantation.

Congeners		No. of chlorine or bromine atoms	Molecular weight ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dw)									
				Summer					Winter				
				B	BOY	LP	ML	C	B	BOY	LP	ML	C
PCB	CB 50+28	4	292-256	1.3±0.2	0.6±0.2	0.4±0.1	1.0±0.6	1.3±0.8	2.9±1.8	0.5±0.3	0.5±0.2	0.5±0.1	0.7±0.2
	CB 52	4	292	16.7±1.5	3.1±1.2	1.8±0.2	1.2±0.6	3.3±2.5	14.4±7.6	4.9±3.0	3.3±0.2	0.4±0.0	2.7±2.5
	CB 101	5	326	14±0.5	3.6±1.8	1.4±0.5	0.9±0.0	4.0±1.7	17.2±8.7	5.1±3.1	1.2±0.0	2.6±0.8	3.4±0.8
	CB 118	5	326	15.7±3.1	5.8±2.2	4.3±0.9	2.3±0.2	5.2±3.6	20.2±11.1	11.5±3.5	8.1±5.0	2.1±1.2	4.3±0.7
	CB 153	6	361	17.8±2.3	9.7±2.3	9.2±2.2	6.4±0.4	15.4±1.7	19.3±6.2	15.3±7.2	11.5±1.8	6.8±1.4	21.7±6.7
	CB 138	6	361	12.9±1.8	6±0.6	4.0±0.9	2.4±0.1	7.3±2.8	11.1±2.5	8.8±3.0	4.7±0.1	3.1±2.5	8.3±1.7
	CB 180	7	395	2.3±0.1	1±0.4	1.5±0.5	0.5±0.1	2.4±0.5	3.6±1.1	1.3±0.2	0.8±0.2	1.1±0.1	2.6±0.2
	Σ PCB			81±9	30±3*	23±4*	15±1*	39±12*	89±39	47±3*	30±3*	17±6*	44±4*
PBDE	BDE 47	4	486	0.9±0.0	0.4±0.3	0.4±0.3	0.4±0.0	0.9±0.2	1.5±0.4	0.5±0.3	0.5±0.3	0.6±0.1	0.5±0.1
	BDE 119	5	565	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	BDE 99	5	565	nd	0.2±0.0	nd	nd	nd	1.5±0.4	0.4±0.0	0.9±0.0	nd	nd
	BDE 153	6	644	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Σ PBDE				0.9±0.0	0.4±0.4	0.4±0.3	0.4±0.0	0.9±0.2	2.9±0.7	0.6±0.3*	1.0±0.7*	0.6±0.1*

B: Bouin; BOY: Boyard; LP: Les Palles; ML: Mus du Loup; C: Cordouan; dw: dry weight; nd: non detected ; * significant differences ($p<0.05$) with B; superscript letters indicate significant ($p<0.05$) differences between transplant sites.

Table 3 Organochlorine pesticide (OCP) content in oyster's flesh (in $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dry weight) at two seasons after 3 months transplantation.

OCP (common name)	No. of chlorine atoms	Molecular weight (g.mol ⁻¹)	Concentration ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ dw)									
			Summer					Winter				
			B	BOY	LP	ML	C	B	BOY	LP	ML	C
HCB	6	285	1.4±0.5	1.6±1.0	1.4±0.3	0.4±0.0	0.4±0.0	1.2±0.6	1.9±0.2	2.2±0.8	0.1±0	0.6±0.1
Lindane	6	291	2.10.4	0.6±0.1	0.4±0.0	0.1±0.1	0.1±0.0	2.2±1.1	0.5±0.2	1.3±0.3	0.6±0	0.7±0.4
2,4'DDE	4	318	2.2±1.0	2.4±1.0	1.5±0.2	0.2±0.0	0.3±0.0	2.5±1.4	5.5±2.9	2.4±1.2	0.2±0.1	0.4±0.2
4,4'DDE + Dieldrin	4-6	318-381	1.4±0.2	3.6±1.3	2.4±0.3	0.9±0.1	1.9±0.1	1.2±0.2	6.8±2.3	3.7±0.9	0.8±0.1	3±1.6
2,4'DDD + (CB154+77)	4-6-4	320-361-295	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4,4'DDD	4	320	2.3±0.0	1.9±0.3	2.0±0.1	1.0±0.0	1.1±0.1	1.5±0.6	2.8±0.4	3.7±0.8	1.9±0.1	3.9±0.4
2,4'DDT	5	355	0.4±0.1	nd	nd	0.2±0.1	0.1±0.1	0.9±0.6	nd	nd	0.8±0.1	1.2±0.2
4,4'DDT	5	355	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Heptachlor	7	373	0.3±0.0	0.8±0.5	0.6±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.2±0.1	1.6±0.7	1.9±1.0	0.5±0.0	0.7±0.3
Heptachlor hepoxide	7	373	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cis-chlordane	8	410	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Trans-nonachlor	9	444	0.6±0.1	nd	nd	0.2±0	0.4±0.0	0.3±0.1	nd	nd	0.1±0.0	0.7±0.3
Mirex + CB170	12-7	546-395	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
∑ OCP			11±2	11±1 ^a	8±0 ^{a,b}	3±0 ^{a,b}	4±0 ^{a,b}	10±5	19±1 ^{a,a}	15±3 ^{a,c}	5±0 ^{b,c}	11±1 ^c

HCB: hexachlorobenzene; DDT: dichlorodiphenyltrichloroethane; DDE: dichlorodiphenyldichloroethylene; DDD: dichlorodiphenyldichloroethane; CB: chlorobiphenyl; B: Bouin; BOY: Boyard; LP: Les Palles; ML: Mus du Loup; C: Cordouan; dw: dry weight; nd: non detected ; * significant differences ($p<0.05$) with B; superscript letters indicate significant ($p<0.05$) differences between transplant sites.

Table 4 Spearman correlation coefficients between contaminant contents in oyster tissues and biological responses per site. Only correlations between contaminants and biological responses showing at least one significant correlation are shown.

Site	Tissue	Parameter	∑ PAHs	∑ PCBs	∑ PBDEs	∑ OCPs
Bouin	Gills	CAT	-0.37	-0.83	-0.20	-0.94**
Boyard	Gills	GPx	0.94**	0.99***	0.26	0.60
		Catecholase	-0.83	-0.94**	-0.14	-0.71
		Laccase	-0.99***	-0.94**	-0.49	-0.54
	Digestive gland	SOD	0.81	0.93**	0.03	0.75
	Mantle	CAT	-0.77	-0.71	-0.26	-0.77
		Lysozyme	-0.60	-0.54	-0.26	-0.94**
	Plasma	CAT	0.60	0.66	-0.09	0.94**
		Catecholase	0.99***	0.94**	0.49	0.54
		Laccase	-0.77	-0.71	-0.26	-0.77
Les Palles	Digestive gland	Laccase	0.03	0.66	0.60	0.94**
	Plasma	CAT	-0.09	-0.94**	-0.99***	-0.77
		Lysozyme	0.03	0.66	0.60	0.94**
Mus du Loup	Gills	SOD	0.93**	-0.55	-0.20	0.81
		MDA	0.83	0.14	0.31	0.94**
		Catecholase	-0.99***	0.26	-0.14	-0.94**
		Lysozyme	-0.94**	0.09	-0.09	-0.83
	Digestive gland	SOD	0.26	0.66	0.94**	0.43
		MDA	-0.71	0.03	-0.37	-0.77
		Lysozyme	-0.99***	0.26	-0.14	-0.94**
	Mantle	GPx	-0.94**	-0.03	-0.21	-0.94**
	Plasma	Catecholase	0.83	0.14	0.31	0.94**
Cordouan	Gills	Lysozyme	0.54	0.03	-0.03	0.94**
	Digestive gland	Lysozyme	0.54	0.31	-0.14	0.94**

p<0.01, *p<0.001. PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons; PCBs: polychlorobiphenyls; PBDEs: polybromodiphenyl ethers; OCPs: organochlorine pesticides; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; SOD: superoxide dismutase; MDA: malondialdehyde.

Table 5 Spearman correlation coefficients between contaminant contents in oyster tissues and biological responses in summer. Only correlations between contaminants and biological responses showing at least one significant correlation are shown.

Oyster tissue	Parameter	∑ light PAHs	∑ heavy PAHs	∑ parent PAHs	∑ alkylated PAHs	∑ PAHs	∑ PCBs	∑ PBDEs	∑ DDTs+ DDDs+ DDEs	∑ OCPs
Whole flesh	Condition index	-0.63	-0.48	-0.60	-0.52	-0.63	-0.30	0.04	-0.66	-0.73
	Dry weight	-0.54	-0.57	-0.67**	-0.38	-0.72**	-0.19	0.10	-0.54	-0.61
Gills	MDA	0.01	0.89***	0.79**	0.10	0.78**	-0.45	-0.58	0.38	0.29
	Catecholase	-0.69**	-0.14	-0.36	-0.50	-0.42	-0.34	-0.10	-0.22	-0.31
Digestive gland	Laccase	0.10	-0.77**	-0.63	-0.05	-0.55	0.54	0.50	-0.53	-0.36
Mantle	Catecholase	-0.52	0.00	-0.19	-0.28	-0.23	-0.65**	-0.06	-0.58	-0.68
	Lysozyme	0.38	0.37	0.43	0.30	0.42	0.28	-0.19	0.81***	0.80***
Plasma	Laccase	0.56	0.00	0.13	0.42	0.14	0.72**	0.24	0.55	0.72**
	Lysozyme	0.51	0.46	0.53	0.37	0.55	0.31	-0.10	0.69**	0.79**

p<0.01, *p<0.001. PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons; PCBs: polychlorobiphenyls; PBDEs: polybromodiphenyl ethers; DDTs: dichlorodiphenyltrichloroethanes; DDEs: dichlorodiphenyldichloroethylenes; DDDs: dichlorodiphenyldichloroethanes; OCPs: organochlorine pesticides; MDA: malondialdehyde.

Table 6 Spearman correlation coefficients between contaminant contents in oyster tissues and biological responses in winter. Only correlations between contaminants and biological responses showing at least one significant correlation are shown.

Oyster tissue	Parameter	Σ light PAHs	Σ heavy PAHs	Σ parent PAHs	Σ alkylated PAHs	Σ PAHs	Σ PCBs	Σ PBDEs	Σ DDTs+DDD+DDEs	Σ OCPs
Whole flesh	Condition index	-0.07	0.75**	0.71**	-0.12	0.67**	-0.56	-0.19	0.13	0.10
	Dry weight	-0.59	0.05	-0.02	-0.59	-0.10	-0.37	-0.52	0.03	-0.16
Gills	MDA	-0.37	0.39	0.36	-0.41	0.35	-0.65**	-0.35	0.01	-0.04
	Catecholase	-0.56	-0.68**	-0.66**	-0.56	-0.70**	-0.04	-0.14	-0.54	-0.62
	Laccase	-0.19	-0.84***	-0.84***	-0.13	-0.79**	0.10	0.30	-0.30	-0.28
Digestive gland	CAT	-0.02	0.68**	0.73**	-0.09	0.66**	-0.25	-0.22	-0.33	-0.33
	GPx	0.02	-0.68**	-0.71**	0.06	-0.63	0.10	0.28	0.17	0.21
	MDA	0.15	0.25	0.30	0.11	0.31	-0.19	-0.55	0.67**	0.56
	Catecholase	-0.64	0.40	0.34	-0.65	0.29	-0.69**	-0.46	-0.23	-0.33
Mantle	SOD	0.68**	0.50	0.55	0.63	0.64	-0.09	0.12	0.53	0.63
	GPx	0.02	-0.68**	-0.71**	0.06	-0.63	0.10	0.28	0.17	0.21
	Laccase	0.33	-0.68**	-0.65**	0.39	-0.58	0.47	0.59	-0.10	0.00
Plasma	SOD	-0.09	0.75**	0.73**	-0.13	0.66**	-0.29	-0.50	0.20	0.11
	Catecholase	0.03	0.78**	0.80***	-0.02	0.75**	-0.11	-0.27	0.01	-0.03
	Laccase	0.45	-0.39	-0.37	0.50	-0.33	0.78**	0.56	0.09	0.14

p<0.01, *p<0.001. PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons; PCBs: polychlorobiphenyls; PBDEs: polychlorobiphenyl ethers; DDT: dichlorodiphenyltrichloroethanes; DDEs: dichlorodiphenyldichloroethylenes; DDDs: dichlorodiphenyldichloroethanes; OCPs: organochlorine pesticides; MDA: malondialdehyde.

Table 7 Spearman correlation coefficients between contaminant contents in oyster tissues and biological responses by polling data from summer and winter. Only correlations between contaminants and biological responses showing at least one significant correlation are shown.

Oyster tissue	Parameter	∑ light PAHs	∑ heavy PAHs	∑ parent PAHs	∑ alkylated PAHs	∑ PAHs	∑ PCBs	∑ PBDEs	∑ DDTs+DDDs+DDEs	∑ OCPs
Whole flesh	Condition index	-0.35	-0.46	-0.45	-0.34	-0.45	-0.46	-0.23	-0.51**	-0.57**
	Dry weight	-0.51**	-0.51	-0.55**	-0.46	-0.58**	-0.41	-0.27	-0.45	-0.56**
Gills	MDA	-0.09	0.72	0.67**	-0.09	0.65**	-0.38	-0.35	0.36	0.32
	Catecholase	-0.54**	-0.64	-0.69**	-0.50**	-0.71**	-0.29	-0.22	-0.46	-0.52**
Plasma	Catecholase	0.35	0.65	0.69**	0.28	0.70**	0.23	0.11	0.32	0.39

p<0.01, *p<0.001. PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons; PCBs: polychlorobiphenyls; PBDEs: polychlorobiphenyl ethers; DDT: dichlorodiphenyltrichloroethanes; DDEs: dichlorodiphenyldichloroethylenes; DDDs: dichlorodiphenyldichloroethanes; OCPs: organochlorine pesticides; MDA: malondialdehyde.

Table 8 Physico-chemical and biological parameters of the reference (Bouin, B) and the transplant sites (Boyard, BOY; Les Palles, LP; Mus du Loup, ML; Cordouan: C) in summer (June) and winter (December), 2008.

	Summer					Winter				
	B	BOY	LP	ML	C	B	BOY	LP	ML	C
Physicochemical parameters										
Temperature (°C) ^a	18 ± 2	19 ± 2	20 ± 2	20 ± 2	21 ± 2	9 ± 2	9 ± 2	8 ± 2	10 ± 3	8 ± 3
Salinity ^a	33 ± 1	33 ± 1	33 ± 1	33 ± 1	33 ± 2	31 ± 2	32 ± 2	31 ± 3	30 ± 3	32 ± 3
Turbidity (NTU) ^a	4 ± 5	6 ± 4	4 ± 1	10 ± 8	4 ± 6	34 ± 27	22 ± 11	12 ± 8	14 ± 12	10 ± 11
Biological parameters										
Chlorophyll <i>a</i> (µg.l ⁻¹)	1.6 ± 1.91 ^a	2.8 ^b	5.4 ± 3.3 ^a	2.6 ^b	3.1 ^a	1.1 ± 0.9 ^a	1.1 ^b	0.8 ± 0.4 ^a	0.6 ^b	1.2 ^a
Phytoplankton (cells.l ⁻¹) ^a										
<i>Cryptophyceae</i> (<i>Cryptophyceae</i>)	10 ⁵⁻⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Asterionellopsis glacialis</i> (<i>Diatomophyceae</i>)	10 ⁵⁻⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chaetoceros sp.</i> (<i>Diatomophyceae</i>)	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	-	10 ³⁻⁴	10 ³⁻⁴	10 ³⁻⁴	-
<i>Cylindrotecha closterium</i> (<i>Diatomophyceae</i>)	-	-	-	-	-	10 ³⁻⁴	10 ³⁻⁴	10 ³⁻⁴	10 ³⁻⁴	-
<i>Guinardia delicatula</i> (<i>Diatomophyceae</i>)	-	-	-	-	10 ⁵⁻⁶	-	-	-	-	-
<i>Leptocylindrus sp.</i> (<i>Diatomophyceae</i>)	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	-	-	-	-	-
<i>Nitzschia longissima</i> (<i>Diatomophyceae</i>)	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	-	-	-	-	10 ³⁻⁴
<i>Paralia sulcata</i> (<i>Diatomophyceae</i>)	-	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	10 ⁵⁻⁶	10 ³⁻⁴	-	10 ³⁻⁴	10 ³⁻⁴	10 ³⁻⁴	10 ⁵⁻⁶
<i>Skeletonema costatum</i> (<i>Diatomophyceae</i>)	10 ⁵⁻⁶	-	-	-	10 ⁵⁻⁶	10 ³⁻⁴	<10 ³	<10 ³	<10 ³	-
<i>Thalassiosira sp.</i> (<i>Diatomophyceae</i>)	-	-	-	-	10 ⁵⁻⁶	10 ³⁻⁴	-	-	-	-
<i>Gymnodiniaceae</i> (<i>Dinophyceae</i>)	-	-	-	-	10 ⁵⁻⁶	-	-	-	-	-
Phytoplankton producing phycotoxins (cells.l ⁻¹) ^a										
<i>Alexandrium sp.</i> (<i>Diatomophyceae</i>)	≤10 ²	≤10 ¹	≤10 ¹	≤10 ¹	10 ³⁻⁴	≤10 ¹	≤10 ¹	≤10 ¹	≤10 ¹	≤10 ²
<i>Dinophysis sp.</i> (<i>Dinophyceae</i>)	≤10 ²	≤10 ²	≤10 ¹	≤10 ¹	≤10 ¹	≤10 ¹	≤10 ¹	≤10 ¹	≤10 ¹	≤10 ¹
<i>Pseudo-nitzschia sp.</i> (<i>Diatomophyceae</i>)	≤10 ⁴	≤10 ³	≤10 ²	≤10 ²	≤10 ⁴	≤10 ¹	≤10 ²	≤10 ¹	≤10 ¹	≤10 ¹
Phycotoxins ^a										
Amnesic shellfish poisoning (ASP)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Paralytic shellfish poisoning (PSP)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fecal contamination (E.coli.100 g ⁻¹ ILC) ^a	<230	<230	<230	<230 to 4 600	<230	<230	<230	<230	<230	<230
Oyster mortality in 2008 ^a										
Adults (%)	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20
Juveniles (%)	35	20	20	20	20	60	70	70	70	70

“-”: not detected

ILC: intervalvular liquid content

^a Mean values ± SD adapted from 2000 to 2004 data of the website “Site Ifremer consacré à l’environnement littoral”: <http://www.ifremer.fr/envlit/>.

^b Mean values of 2008, collected by the French network Razlec (Ifremer, http://www.ifremer.fr/lerpc/reseaux/hydro/resul_hydro.htm). Values correspond to the mean of June and December of 2008 of two measurements carried out per month at the bottom and at the top of the water surface from ML and sites near BOY and LP.

Table 9 Chemical contaminants contents in oysters from the reference (Bouin, B) and the transplant sites (Boyard, BOY; Les Palles, LP; Mus du Loup, ML; Cordouan: C) between 2003 and 2007.

Pollutant contents ^a		National median	Sites				
			B	BOY	LP	ML	C
Metals (mg.kg ⁻¹)	Ag	7.69	19.50	16.20	29.90	12.30	37.65
	Cd	1.61	1.75	2.75	3.82	3.73	15.55
	Cr	0.84	1.07	1.04	1.29	1.23	1.63
	Cu	206	385	281	500	262	772
	Hg	0.20	0.19	0.32	0.36	0.32	0.19
	Ni	1.01	1.30	1.22	1.22	1.28	1.44
	Pb	1.30	1.30	1.45	1.55	1.60	2.03
	V	1.32	1.32	1.33	1.72	1.75	2
Pesticides (µg.kg ⁻¹)	DDT, metabolites	5.22	5.76	4.28	5.03	8.31	16.48
	Lindane	0.74	0.39	0.79	0.46	0.90	0.43
PAHs (µg.kg ⁻¹)	Fluoranthene	27.0	20.2	27.8	23.5	33.7	22.61
PCBs (µg.kg ⁻¹)	PCB153	17.35	36.75	16.09	16.79	15.53	65.16

^a Mean values adapted from 2003 to 2007 data of the website "Site Ifremer consacré à l'environnement littoral": <http://www.ifremer.fr/env/>

Les phénoloxydases chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : Biomarqueurs potentiels de stress environnemental

Résumé

L'huître creuse *Crassostrea gigas* est le produit aquacole le plus commercialisé dans le monde. Cependant, en France et dans d'autres régions du monde, des mortalités estivales massives affectent de façon alarmante les populations naturelles et cultivées de cette espèce, surtout aux stades juvéniles. Ces événements sembleraient être liés à un déséquilibre entre les acteurs de la triade hôte – agent pathogène – environnement, favorisant l'affaiblissement des mécanismes de défense de l'hôte, et par conséquent, l'apparition et/ou l'augmentation de maladies. Parmi les facteurs environnementaux pouvant contribuer à ce déséquilibre, les contaminants chimiques sont connus pour moduler les capacités de défense de divers organismes aquatiques. Les phénoloxydases (PO) sont les enzymes-clés d'une cascade biochimique responsable de la production de mélanine et sont impliquées dans les défenses immunitaires et dans la reconnaissance du non-soi chez les invertébrés. Récemment, une activité de type PO a été détectée chez *C. gigas*, et a été proposée comme biomarqueur potentiel de la contamination chimique. Cependant, de nombreuses inconnues existent quant aux différents types d'activité PO présents chez *C. gigas*, et à leur implication dans les mécanismes de défense chez cette espèce. Dans ce contexte général, les objectifs de cette thèse ont été d'1) identifier les différents types de PO présents dans différents tissus de l'huître 2) évaluer le potentiel des PO en tant que biomarqueurs dans des expériences d'exposition *in vivo* à des contaminants organiques, 3) évaluer le potentiel des PO en tant que biomarqueurs dans des études de biosurveillance *in situ*. Nous avons pu montrer, pour la première fois chez cette espèce, l'existence de deux types d'activité PO : une activité catécholase et une activité laccase. De plus, nous avons pu mettre en évidence *in vitro* un effet bactéricide lié à l'activité des POs contre deux souches pathogènes de l'huître, *Vibrio splendidus* et *V. aesturianus*, dont leur présence a été fréquemment associée aux phénomènes de mortalités estivales. Enfin, grâce à une analyse multi-biomarqueurs sur différents tissus de *C. gigas*, l'ensemble des résultats ont permis de proposer que les PO pourraient être utilisées comme biomarqueurs de stress environnemental, plutôt que de contamination, dans la surveillance de la qualité des eaux côtières et estuariennes.

Mots clés : bivalve – phénoloxydases – biomarqueur – stress environnemental – contamination chimique

Phenoloxidases in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Potential biomarkers of environmental stress

Abstract

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is the leading aquaculture product at the worldwide level. However, massive summer mortalities affect dramatically cultivated and natural oyster populations, especially at young life stages. These events could be linked to an unbalance between the different actors of the triad host – pathogen agent – environment, which could favour a weakening of defence mechanisms in the host, and consequently, the emergence and/or increase of diseases. Among environmental factors that could contribute to this unbalance, chemical contaminants are known to modulate defence capacities in different aquatic organisms. Phenoloxidases (POs) are the key enzymes of a biochemical cascade responsible for the production of melanin and are implicated in immune defences and in self/non-self recognition in invertebrates. Recently, a PO-like activity was detected in *C. gigas*, and was suggested as a potential biomarker of chemical contamination. However, little is known on the different PO activities present in *C. gigas*, and on their implication in defence mechanisms in this species. In this general context, the aims of this work were to 1) identify the different types of PO present in different tissues of *C. gigas* 2) evaluate their potential as biomarkers in experiments of *in vivo* exposure to organic contaminants, 3) evaluate their potential as biomarkers in *in situ* biomonitoring studies. We showed, for the first time in this species, the existence of two PO-type activities: a catecholase activity and a laccase activity. Moreover, we observed an *in vitro* bactericidal effect associated to PO activities against two oyster pathogens, *Vibrio splendidus* and *V. aesturianus*, which have often been associated to massive summer mortalities in oysters. Finally, based on a multiple-biomarker analysis in different tissues of *C. gigas*, results suggest that POs could be used as biomarkers of environmental stress, rather than of contamination, for biomonitoring studies in coasts and estuaries.

Keywords: bivalve – phenoloxidases – biomarker – environmental stress – chemical contamination



Laboratoire LIENSs
UMR 6250, CNRS-ULR : Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés
2, Rue Olympe de Gouges - 17042 LA ROCHELLE CEDEX